

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1967 - N° 233

TITRE DE LA THÈSE

LE DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE L'AMIBIASE
PAR IMMUNO-FLUORESCENCE
A PROPOS DE 560 EXAMENS

THÈSE

présentée

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenue publiquement le 20 Décembre 1967
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Jean-Pierre GEORGET

*Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire
Moniteur au Laboratoire de Parasitologie et de Pathologie Tropicale
de la Faculté de Médecine de Lyon*

né le 24 Février 1942

à SAINTES (17)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552601_0025

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1967 - N°

TITRE DE LA THÈSE

LE DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE L'AMIBIASE
PAR IMMUNO-FLUORESCENCE
A PROPOS DE 560 EXAMENS

THÈSE

présentée

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenue publiquement le 20 Décembre 1967
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Jean-Pierre GEORGET

*Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire
Moniteur au Laboratoire de Parasitologie et de Pathologie Tropicale
de la Faculté de Médecine de Lyon*

né le 24 Février 1942

à SAINTES (17)

Année 1967 - N°

TITRE DE LA THÈSE

LE DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE L'AMBIASE
PAR IMMUNO-FLUORESCENCE
A PROPOS DE 830 EXAMENS

THÈSE

présentée

à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenue publiquement le 26 Décembre 1967
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine



Jean-Pierre GEORGET

Assisté par le Docteur en Pharmacie Jean LAMBERT
Membre du Jury de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

et le Docteur en Médecine

A SAINT-ETIENNE

P E R S O N N E L de la F A C U L T E

Doyen Honoraire :

M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen :

M. J.F. CIER

Assesseurs :

M. M. LEVRAT
M. J. DORCHE

Conseiller Administratif :

M. H. PRUVOST

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. TRILLAT - GARIN - GATE - MARTIN - GABRIELLE
SANTY - DUCLOS - GUILLEMINET - HERMANN
ROCHET - POLLOSSON - ENSELME - WERTHEIMER
SARROUY - BANSSILLON - DECHAUME - LACROIX

PROFESSEURS

MM. J. CIBERT	Clinique urologique
P. PONTIUS	Physique biologique (détaché à Beyrouth)
M. CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
F. PAUPERT-RAVAULT	Clinique Médicale B
R. FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
P. CROIZAT	Clinique médicale C
P. MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
L. REVOL	Pharmacie galénique
H. PIGEAUD	Clinique Obstétricale
J. BOURRET	Médecine du travail
M. LEVRAT	Clinique médicale A
R. SOHIER	Bactériologie - Virologie - Immunologie
G. NETIEN	Botanique et Cryptogamie
P. BERTRAND	Clinique chirurgicale C
A. BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
B. DREVON	Pharmacie chimique et Pharmacologie
L. ROCHE	Médecine légale et Déontologie
J. COUDERT	Parasitologie et Pathologie exotique

MM. P. MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audiophonologie
L. PAUFIQUE	Clinique Ophtalmologique
H. THIERS	Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie
J. BRUN	Clinique de Pneumophtisiologie
J. CREYSSEL	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique
M. DARGENT	Clinique carcinologique
M. BERGER (1)	Physique nucléaire appliquée à la Médecine
A. GUICHARD	Anatomie pathologique
P. GIRARD	Clinique Neuro-Psychiatrique et d'Hygiène Mentale
M. GIRARD	Clinique Médicale D
M. LATARJET	Anatomie
R. PEYCELON	Clinique Chirurgicale B
A. VACHON	Pathologie Médicale
P. GALY	Physio-Pathologie des voies respiratoires
J. PAPILLON	Radiologie
M. JEUNE	Clinique Médicale Infantile et Hygiène du Premier Age
A. GONIN	Thérapeutique
P. MONNET	Clinique Médicale Infantile B
J. CHATONNET	Physiologie B
P. GUINET	Clinique Endocrinologique
H. COLLET (1)	Chimie Générale et Pharmaceutique
A. TRILLAT	Clinique de Chirurgie Orthopédique
Ch. FREIDEL	Clinique Stomatologique
J. MARION	Clinique de Chirurgie et d'Orthopédie Infantiles
J. DORCHE	Matière Médicale et Législation Pharmaceutique
L. MANSUY	Neurochirurgie
L. REVOL (1)	Hématologie
J. LECUIRE (1)	Clinique Chirurgicale propédeutique
L. PERROT	Chimie
J.F. CIER	Physiologie A
J. PERRIN	Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie opératoire
P. GOINARD (1)	Clinique Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie expérimentale
P. MICHAUD	Clinique de Chirurgie cardiaque
M. PONT (1)	Médecine Générale
J. TRAEGER	Clinique de Néphrologie et maladies métaboliques
J. MATHIEU	Clinique Gynécologique
G. FAUCON	Biologie Médicale et Pharmacodynamie
A. BERTOYE	Clinique des Maladies Infectieuses
G. VIGNON	Hydrologie Thérapeutique, Climatologie et Ecologie Sociale
D. VINCENT	Biochimie Appliquée
A. CIER	Pharmacodynamie
L. COLOBERT	Chimie Biologique et Médicale
P. MAGNIN	Physiologie et Pathologie obstétricales
J. THIVOLET	Hygiène et Action Sanitaire et Sociale
M. PLAUCHU (1)	Médecine Générale
J. FRANCILLON	Séméiologie Chirurgicale
C. GIROD	Histologie et Embryologie
X	Pathologie Chirurgicale
X	Pathologie Générale et Expérimentale

(1) Professeurs à titre personnel.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. E. ROMAN	Parasitologie
J. FEROLDI	Anatomie Pathologique
R. MORET	Physique Biologique
L. ODDOUX	Botanique et Cryptogamie
C. DESPIERRES	Médecine Générale
J.P. GARIN	Parasitologie
F. TOLOT	Médecine du Travail
R. MALLEIN	Chimie Analytique
E. PINET	Electro-Radiologie
D. COLOMB	Dermatologie
R. FRANCOIS	Pédiatrie
M. COLIN	Médecine Légale
F. LARBRE	Pédiatrie
J. GRAS	Chimie Biologique

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

MM. R. CREYSSEL	Chimie biologique
J. GUYOTAT	Neuro-Psychiatrie
J. DESCOTES	Chirurgie générale
M. JOUVET	Pathologie expérimentale
J.O. PEYRIN	Physique biologique
M. TOMMASI	Anatomie Pathologique
P. BUFFARD	Electro-Radiologie
E. LEJEUNE	Médecine générale et Thérapeutique
Fr. de MOURGUES	Stomatologie
H. NAUSSAC	Maladies Infectieuses
J. REBOUILLAT	Chirurgie Générale
G. ROMAGNY	Pédiatrie
J.P. DELAHAYE	Médecine Générale
R. DELEUZE	Anesthésiologie
M. GIRAUD	Electro-Radiologie diagnostic et thérapeutique
A. MICHEL	Anesthésiologie
J. MICHOUPLIER	Chirurgie générale
R. LAMBERT	Médecine générale
D. FRIES	Médecine générale
R. GILLY	Pédiatrie
J. ROBERT	Médecine générale
A. BOUCHET	Anatomie
M. BETHENOD	Pédiatrie
D. GERMAIN	Immunologie, Sérologie, hématologie
J.C. KALB	Pneumo-phtisiologie
J. SOUSTELLE	Chirurgie générale
J.J. VIALA	Médecine générale
P. VINCENT	Bactériologie, parasitologie, virologie
J.A. BERTRAND	Chimie biologique
G. MARET	Chirurgie générale
J. VIALLIER-RAYNARD	Bactériologie
L.C. CHOLLAT	Electro-Radiologie

MM. J. FLEURETTE	Bactériologie
R. FLANDROIS	Physiologie
P. MOREL	Hématologie
H. TERMET	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
A. FREDERICH	Pharmacologie
M. DAUDET	Chirurgie Infantile
J. BRUNE	Médecine générale et Thérapeutique
R. LOMBARD-PLATET	Chirurgie générale
M. BOUVIER	Rhumatologie
F. FREYCON	Pédiatrie
C. LAPRAS	Neuro-Chirurgie
M. PELLET	Physiologie
J. DUQUESNEL	Electro-Radiologie
H. DEJOUR	Orthopédie et Traumatologie
G. MOULIN	Dermato-vénérologie
M. PERRIN-FAYOLLE	Pneumo-phtisiologie
P. PALIARD	Médecine générale et Thérapeutique
A. MORGON	Oto-Rhino-Laryngologie
M. PAUPERT-RAVAULT	Ophtalmologie
J. MOTIN	Anesthésiologie
J. PASQUIER	Médecine générale et Thérapeutique
J.L. VAUZELLE	Anatomie Pathologique
J.C. CZYBA	Histologie et Embryologie
M. CABANAC	Physiologie
R. TOURAINE	Pneumo-phtisiologie
A. BEL	Médecine générale et Thérapeutique
F. CHARVET	Gynécologie - Obstétrique
M. MAYER	Cancérologie
G. BRAILLON	Anatomie et Chirurgie générale
H. VILLIERS	Chirurgie générale
P. LOUISOT	Chimie biologique et Chimie des Explorations Fonctionnelles
J. COURJON	Neuro-Psychiatrie.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

MM. J. FAVRE-GILLY	Hématologie
G. RIFFAT	Hygiène
M. ROLLET	Pharmacie galénique
C. BIZOLLON	Physique

AGREGES EN EXERCICE

MM. A. NOTTER	Gynécologie obstétricale
M. DUMONT	Obstétrique
B. SCHOTT	Neuro-psychiatrie
M. DEVIC	Médecine générale
R. HUGONNIER	Ophtalmologie
G. ALLEGRE	Neuro-chirurgie
A. GARDE	Médecine générale
R. FAYSSE	Orthopédie

MM. J. GAILLARD	Oto-Rhino-Laryngologie
A. PERRIN	Médecine générale
J. NORMAND	Médecine générale
A. MOUNIER-KUHN	Chirurgie générale
J.L. CHASSARD	Electro-Radiologie
R. GARMIER	Obstétrique
P. DUMAS	Stomatologie
J. SCHNEPP	Orthopédie
G. NOEL	Médecine générale

Examineurs de la Thèse :

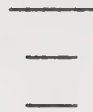
- Président : M. Le Professeur J. COUDERT
- Assesseurs: MM. J. VACHON
 - A. BERTOYE
 - J.P. GARIN

A MA FEMME

A NOS FAMILLES

A NOS AMIS

A TOUS CEUX QUI NOUS SONT CHERS



A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. COUDERT

Professeur de Parasitologie et Pathologie Exotique
à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie
de Lyon

Biologiste des Hôpitaux

Avec sa bienveillance et sa générosité habituelles, il nous a ouvert les portes de son Laboratoire et a bien voulu nous faire participer à l'enseignement pratique de sa chaire.

Tout au long de ce travail, dont il a suivi chacune des étapes, il a bien voulu nous faire bénéficier de ses connaissances et de ses conseils.

Pendant les trois années passées dans son Service, nous avons été particulièrement sensible à l'atmosphère qu'il sait créer autour de lui.

Qu'il veuille trouver ici, l'expression de notre profonde gratitude et de notre respectueuse admiration.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR VACHON

Professeur de Pathologie Médicale
Chef du Service de Gastro-Entérologie à l'Hôtel-Dieu

Au cours du semestre passé dans son service, nous avons bénéficié de son enseignement clinique.

C'est un très grand honneur qu'il nous a fait en acceptant de siéger dans notre Jury.

Qu'il veuille bien trouver ici,
l'expression de notre profond respect.

MONSIEUR LE PROFESSEUR BERTOYE

Chef de Service de la Clinique des Maladies Infectieuses
à l'Hôpital de la Croix-Rousse

Nous le remercions de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail et nous sommes très sensible à l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger notre Thèse.

Qu'il veuille bien trouver ici,
l'expression de notre respectueuse considération.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J.P. GARIN

Professeur sans Chaire
Biologiste des Hôpitaux

En nous proposant le sujet de cette Thèse, il nous a témoigné sa confiance. Nous espérons en avoir été digne.

Il a suivi nos efforts avec intérêt et a su canaliser nos recherches avec la simplicité et la rigueur scientifique qui le caractérisent.

A travers lui, nous remercions son Service de consultations de Pathologie Exotique à l'Hôpital de la Croix-Rousse qui nous a fourni la majorité de nos sérums et de nos observations.

Qu'il veuille bien trouver ici, l'expression de notre profonde gratitude.

AU DOCTEUR PIERRE AMBROISE-THOMAS

Assistant au Laboratoire de Parasitologie
et de Pathologie Exotique de la Faculté
de Médecine de Lyon

Très vite, il nous a adopté dans son équipe. Il a guidé nos premiers pas dans cette technique nouvelle pour nous, et depuis il a toujours suivi de près notre travail.

Il nous a apporté son aide avec dynamisme, gentillesse et une singulière efficacité qui a toujours fait notre admiration.

La sympathie et l'estime que nous lui portons, n'ont fait que croître à son contact. C'est avec regret que nous quitterons cette équipe dont il est l'animateur.

Qu'il veuille bien trouver ici, l'expression de notre sincère gratitude et de notre fidèle dévouement.

AU DOCTEUR KIEM TRUONG THAI
Assistant au Laboratoire de Parasitologie

Nous le remercions pour l'aide efficace et patiente qu'il nous a apportée en ce qui concerne en particulier, la technique de diffusion en gélose, et la conservation de nos suspensions sous forme lyophilisée.

En témoignage d'estime profonde et de sincère amitié.

A TOUTE L'EQUIPE D'IMMUNO-FLUORESCENCE

- . A Monsieur le Docteur M.A. POTHIER
- . A Madame le Docteur A. CORNET
- . A Madame MINJAT
- . A Madame C. LIOU
- . A Madame TROUSSEAU
- . A Madame MOULIN

A L'ENSEMBLE DE L'EQUIPE DU LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE
ET DE PATHOLOGIE EXOTIQUE DE LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

ET EN PARTICULIER

A MADAME SIMON

C'est auprès d'elle que nous avons
appris les éléments de base du tra-
vail de Laboratoire. Depuis lors, il
n'y a pas eu de jour où nous n'ayons
bénéficié de son aide et de ses
conseils.

Avec la bonté et la patience qui lui
sont habituelles, elle nous a permis
de résoudre bien des problèmes matériels.

Nous l'assurons de notre respectueuse
gratitude.

A MADEMOISELLE LE DOCTEUR M.R. BATTESTI

Chef de Travaux à la Faculté

Assistante de Biologie
à l'Hôpital Edouard Herriot

Qui a bien voulu nous associer à son
enseignement pratique et guider nos
premiers pas dans cette voie.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR E. ROMAN

A MONSIEUR LE DOCTEUR DESPEIGNES

A MADEMOISELLE LE DOCTEUR J. MICHEL-BRUN

NOUS REMERCIONS

MONSIEUR LE MEDECIN COLONEL FELIX
Professeur Agrégé du Val de Grâce
Médecin Chef du Service de Médecine à l'Hôpital
d'Instruction des Armées Desgenettes

MONSIEUR LE MEDECIN LIEUTENANT COLONEL BONNET
Du Service des Maladies Contagieuses de l'Hôpital
d'Instruction des Armées Desgenettes

MONSIEUR LE MEDECIN LIEUTENANT COLONEL BEAUBERNARD
Chirurgien Chef de l'Hôpital de DSCHANG (Cameroun)

MADEMOISELLE LE PROFESSEUR AGREGE HO THI SANG
De La Faculté de Médecine de Paris

MONSIEUR LE PROFESSEUR MICHEL-REY
De la Faculté de Médecine de DAKAR

MONSIEUR LE DOCTEUR LAMBERT
Des Laboratoires CIBA à Bâle

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE KREMER
De la Faculté de Médecine de Strasbourg

MONSIEUR LE DOCTEUR R. HOUIN
Chef de Travaux à la Faculté de Médecine de Paris

MONSIEUR LE DOCTEUR NGUON-HOA
De la Faculté Royale Mixte de Pharmacie et de Médecine
de PHNOM-PENH

Pour l'aide très précieuse qu'ils nous ont apportée en nous
adressant les sérums et les observations de leurs malades.

A MONSIEUR LE MEDECIN GENERAL INSPECTEUR BORON

Professeur Agrégé du Val de Grâce

Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital d'Instruction des Armées Desgenettes

A MONSIEUR LE MEDECIN COLONEL GROSSETETE

Bactériologiste des Hôpitaux des Armées

Médecin Chef de l'Hôpital d'Instruction
des Armées Desgenettes

A NOS MAITRES DE LA FACULTE DE MEDECINE DE LYON
DES HOPITAUX CIVILS
DE L'HOPITAL D'INSTRUCTION DES ARMEES DES GENETTES

A MONSIEUR LE MEDECIN COLONEL J. VITTORI
Professeur Agrégé du Val de Grâce
Chef du Service de Chirurgie

A MONSIEUR LE MEDECIN COLONEL BONJEAN
Spécialiste des Hôpitaux Militaires
Chef du Service de Dermatologie

Les semestres que nous avons passés dans leurs services au
cours de notre stage interne de 6ème année de médecine ont
été particulièrement enrichissants pour nous

Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de notre
profond respect

LE DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE

DE L'AMIBIASE

PAR IMMUNO-FLUORESCENCE

A PROPOS DE 560 EXAMENS

Dès 1914 (IZAR) les cliniciens ont senti la nécessité d'une épreuve biologique venant compléter les examens coprologiques classiques pour le diagnostic de l'amibiase.

En effet, les difficultés rencontrées pour obtenir un examen coprologique précis, pour faire la relation entre cet examen et les signes cliniques, ou pour affirmer la pathogénicité du parasite en cause, rendent intéressantes les méthodes de mise en évidence des anticorps témoins de la défense de l'organisme ou de la présence du parasite.

Malheureusement, ce diagnostic sérologique n'a pu jusqu'ici passer dans la pratique courante. C'est qu'il se heurte à d'importantes difficultés d'ordre matériel : la préparation et la purification de quantités suffisantes d'antigène amibien.

A l'encontre des autres méthodes, l'immuno-fluorescence qui peut utiliser comme antigène les amibes elles-mêmes, et non une substance extraite de ces parasites, semblait présenter un intérêt tout particulier dans le domaine de l'amibiase.

Profitant de l'expérience acquise depuis plusieurs années au Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de LYON, nous nous sommes donc attaché à mettre au point une réaction d'immuno-fluorescence

pour le diagnostic sérologique de l'amibiase. Ce travail se poursuit depuis trois ans sous la direction du Docteur AMBROISE-THOMAS, et nous avons pu proposer différentes améliorations pratiques qui font que nous disposons, depuis deux ans, d'une méthode parfaitement au point.

Nous avons appliqué cette réaction à l'étude de plus de 560 sérums dont 390 environ prélevés chez des amibiens ou des sujets suspects d'amibiase. Ces sérums nous ont été adressés par plusieurs correspondants français et étrangers.

Les résultats obtenus au cours de ces 560 examens nous ont permis d'apprécier la spécificité et la sensibilité de cette méthode, de préciser son intérêt comme moyen de diagnostic ou de contrôle de l'efficacité thérapeutique.

Avant d'en venir à nos travaux proprement dits, nous dresserons un tableau des méthodes employées jusqu'à ce jour, de manière à replacer notre technique dans un cadre plus général.

o

o o

P L A N

Au cours de ce travail nous envisagerons successivement :

- . Rappel des notions fondamentales.

CHAPITRE I

- . Diagnostic sérologique de l'amibiase par les réactions autres que l'immuno-fluorescence
- . Allergie cutanée
- . Réactions avec antigènes solubles
 - fixation du complément
 - hémagglutination
 - précipitin-test de MOAN
 - diffusion en gélose et Immuno-électrophorèse
- . Réactions avec antigènes figurés
 - Immobilisation des trophozoïtes
 - Agglutination des kystes et des trophozoïtes
 - Inhibition du pouvoir phagocytaire vis-à-vis des globules rouges.

CHAPITRE II

- . Résultats obtenus jusqu'ici par l'immuno-fluorescence appliquée à l'amibiase

- . Utilisation de la méthode directe d'immuno-fluorescence
- . Utilisation de la méthode indirecte : séro-diagnostic de l'amibiase humaine.

CHAPITRE III

. TRAVAUX PERSONNELS

I - Etude expérimentale

- . L'antigène, origine, préparation, conservation
- . Les sérums
- . Les conjugués
- . La contre-coloration

II - Technique proposée

III - Intérêt de notre technique

- . Avantages matériels
- . Spécificité
- . Sensibilité
- . Reproductibilité

IV - Résultats obtenus dans l'étude de sérums prélevés au cours d'amibiases expérimentales ou d'amibiases humaines spontanées

- . Abscès du foie expérimentaux chez les hamsters

- . Amibiases humaines
 - Formes hépatiques
 - Formes intestinales
- . Valeur diagnostique de l'immuno-fluorescence
- . Comparaison avec la réaction de diffusion en gélose
- . Valeur de la réaction d'immuno-fluorescence comme moyen de contrôle post-thérapeutique

V - Les acquisitions et les perspectives de l'Immuno-fluorescence appliquée à l'amibiase.

VI - Conclusions.

◦
◦ ◦

RAPPEL DES NOTIONS FONDAMENTALES

Pour mieux situer la place et l'intérêt de la séro-immunologie dans l'amibiase, nous rappellerons très brièvement quelques données sur la parasitologie de cette affection.

L' Amibiase humaine est due à Entamoeba histolytica. La contamination est liée à l'ingestion de kystes en même temps que des aliments ou de l'eau souillés.

Dans l'intestin chacun de ces kystes libère une amibe quadrinuclée. Celle-ci, par division, donne naissance à 4 amibes de petite taille, les formes minuta, qui mesurent 15 microns environ et ont un noyau dont la structure chromatiniène est caractéristique de l'espèce.

Ces parasites peuvent alors évoluer de deux façons différentes :

1 - Cycle non pathogène comportant uniquement des formes minuta qui vivent à la surface de la muqueuse intestinale, se nourrissent de débris alimentaires et ne sont pas hématophages.

Ces formes minuta peuvent donner naissance à de nouveaux kystes de 10 à 20 microns de diamètre et comportant quatre noyaux au maximum. Ces kystes sont éliminés avec les selles du sujet parasité. Ils constituent la forme de résistance et de dissémination.

Les formes minuta se comportent comme de simples saprophytes. Les sujets qui les hébergent, les " porteurs sains " ne présentent aucun trouble tant que le parasite reste sous cette forme.

2 - Cycle pathogène.

Il apparaît sous diverses influences : affections intercurrentes ou même simple altération de l'état général du sujet, modifications

de la flore microbienne intestinale, etc... On assiste alors à des transformations morphologiques et biologiques des parasites qui passent de la forme minuta à la forme histolytica.

Du point de vue morphologique les amibes augmentent de taille, 20 à 30 microns et deviennent plus mobiles.

Leur biologie est également modifiée : elles deviennent hémato-phages et grâce à leur pouvoir histolytique elles pénètrent dans l'épaisseur de la paroi intestinale. Cette pénétration entraîne des lésions responsables des symptômes observés au cours des crises d'amibiase intestinale aiguë.

Les formes histolytiques peuvent également atteindre des vaisseaux mésentériques. Le courant porte les entraîne alors en direction du foie où elles déterminent une hépatite puis un abcès. Enfin, dans certains cas assez rares, le filtre hépatique est franchi et les amibes viennent se fixer dans différents organes.

Les formes histolytica peuvent se différencier et revenir à la forme minuta : c'est le passage de l'amibiase aiguë à l'amibiase chronique. Par contre, les formes histolytica ne peuvent se transformer directement en kystes.

De ce rappel parasitologique découlent les caractères fondamentaux du diagnostic direct ou du diagnostic sérologique de l'amibiase.

Le diagnostic direct est basé sur la mise en évidence du parasite.

Dans les formes intestinales il est réalisé par l'examen coprologique qui, pour affirmer l'existence d'une amibiase aiguë, doit montrer des formes histolytica. La fragilité de ces éléments rend nécessaire un examen extemporané de selles fraîchement émises ou l'emploi de méthodes de fixation-coloration. L'identification précise de l'espèce parasitaire est souvent délicate.

Dans les formes extra-intestinales et surtout hépatiques le parasite n'est que difficilement retrouvé dans le liquide de ponction.

En théorie le diagnostic direct peut être complété par la mise en culture des prélèvements. Malheureusement, ces cultures donnent des résultats très irréguliers étant donné le rôle important qu'y joue la flore microbienne associée.

Le diagnostic sérologique ne fournit que des arguments indirects en mettant en évidence des anticorps témoins de la présence du parasite dans les tissus. Il est donc susceptible de distinguer les amibiases " infection " des amibiases " maladie ". Dans les premières seules sont présentes des formes minuta qui restent dans la lumière intestinale et ne doivent provoquer qu'une réponse immunologique très faible et très inconstante. Au contraire, dans les amibiases aiguës et surtout dans les formes hépatiques, les formes histolytica situées dans les tissus peuvent induire la formation d'une quantité importante d'anticorps spécifiques.

o

o o

Chapitre I

DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE L'AMIBIASE

PAR LES REACTIONS AUTRES

QUE L' IMMUNO-FLUORESCENCE

Depuis le travail d'IZAR (1914) de très nombreuses recherches ont été consacrées au diagnostic sérologique de l'amibiase.

Si on excepte ce qui a été réalisé depuis M. GOLDMAN par l'immuno-fluorescence en 1953, ces travaux ont été essentiellement effectués par des techniques classiques avec des antigènes solubles (fixation du complément, agglutination, précipitation en gélose), ou par des méthodes employant un antigène figuré (agglutination des trophozoïtes ou des kystes, immobilisation des trophozoïtes).

A l'exception de quelques essais de précipitation simple en gélose, nous n'avons pas d'expérience personnelle de ces méthodes.

Il nous a pourtant semblé utile d'en faire un bilan pour tenter de clarifier le problème de la sérologie amibienne.

Nous envisagerons ces travaux en les groupant par techniques. Dans chaque cas nous considérerons successivement :

- les modalités opératoires
- la spécificité et la valeur diagnostique

- l'intérêt comme moyen de contrôle thérapeutique.

Recherche de l'allergie cutanée.

Nous ne mentionnons que pour mémoire les résultats obtenus par cette méthode très peu utilisée en pratique.

- La première tentative remonte à 1923 avec les travaux de SCALAS, utilisant un antigène préparé à partir de selles muco-sanglantes d'un malade atteint d'amibiase aiguë.

Par filtration et stérilisation on a préparé un antigène qui a été injecté à des amibiens, à des sujets sains ou à des malades atteints de diverses affections. Si elle existe, la réaction est de type allergique, tuberculinique et la lecture intervient 24 à 48 heures après l'injection.

Chez les amibiens aigus, la réaction a été positive (avec papules de 5 à 6 centimètres de diamètre), dans cinq cas sur neuf. Des résultats constamment négatifs étaient observés chez 5 individus sains, 8 malades présentant une colite non amibienne et 11 sujets atteints de troubles variés.

Ces résultats n'ont pas été confirmés par les études ultérieures de SPECTOR (1932) et plus récemment de SECRET (1952).

- En 1953, la question fut reprise par LEAL, utilisant un antigène préparé à partir de diverses souches d'*Entamoeba histolytica* et d'*Entamoeba moshkowskyi*.

Les réactions positives se traduisent également par une papule assez volumineuse (8 à 10 cms de circonférence). Sur 141 sujets examinés, l'auteur constate que, dans l'ensemble, les résultats de l'intra-dermo-réaction et des examens parasitologiques sont parallèles, et que les

antigènes préparés avec *Entamoeba histolytica* ou avec *Entamoeba moshkowsky* donnent des résultats équivalents.

Comme nous le verrons, cette constatation faite à propos de l'allergie cutanée n'est pas vérifiée dans le domaine de la sérologie où, au contraire, *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba moshkowsky* réagissent de façon différente au point de vue antigénique.

- Enfin, en 1955, VILLARI et DIGILIO employèrent un antigène préparé à partir de cultures d'*Entamoeba histolytica* et comme contrôle, un antigène extrait uniquement de la flore associée.

Quarante sujets ont été étudiés : 20 présentaient une amibiase intestinale, 10 une colite non amibienne et 10 étaient indemnes de toute affection.

Sur les 20 cas d'amibiase, 18 présentèrent une intra-dermo-réaction positive. Aucune réaction positive n'a été observée chez les sujets non amibiens.

Malgré ces résultats assez encourageants dans l'ensemble, l'intra-dermo-réaction n'est pratiquement plus utilisée en matière d'amibiase. Cette méthode exige un antigène qui est difficilement préparé. Elle manque de précision et n'a qu'une valeur d'orientation.

°
° °

I - REACTIONS SEROLOGIQUES AVEC ANTIGENES SOLUBLES

Ces méthodes ont été les plus utilisées jusqu'ici, mais elles n'ont pu, dans l'ensemble, passer dans la pratique courante, étant donné les difficultés d'obtention de l'antigène.

1° - REACTIONS DE FIXATION DU COMPLEMENT

Elle fut la première technique sérologique appliquée à l'amibiase (IZAR 1914).

Depuis lors, de très nombreux travaux ont été réalisés par cette méthode, et nous avons pu relever dans la littérature plus de 50 publications portant sur cette question. Il est assez malaisé de comparer ces travaux entre eux, étant donné les différents types d'antigènes employés par les auteurs, les variations de mode opératoire, et surtout le fait qu'un grand nombre de publications ne mentionnent pas les conditions dans lesquelles les contrôles parasitologiques ont été effectués.

A - Matériel et méthodes

a) L'antigène

Comme l'indiquent de BLAZI et MAGGAUDA-BORZI, l'antigène a été préparé de façons très diverses.

Ce sont dans l'ensemble :

- des extraits aqueux de selles dysentériques (IZAR) ou de pus d'abcès amibien (TRIBONDEAU et FISCHER 1916).

- des extraits de cultures amibiennes sur différents milieux (CRAIG, TSUSHIYA et la plupart des auteurs).

Pour la préparation de l'antigène, on réalise des suspensions d'amibes dont la densité parasitaire varie largement suivant les auteurs (de 600 000 trophozoïtes à 4 000 000 par millilitre).

Les procédés d'extraction ont été également très variés :

- extraction alcoolique (CRAIG)
- extraction aqueuse (BOZICEVICH, etc...)
- succession de congélations et de décongélations (FULTON, ELSDON - DEW).
- ultra-sonification (HEINZ).

b) Techniques opératoires

Les premiers travaux ont été réalisés par une technique de fixation à la température ordinaire, mais c'est la technique de KOLMER (fixation à froid pendant 16 à 18 heures) qui tend à prévaloir depuis ces dix dernières années.

Par ailleurs, il faut mentionner les travaux de KASLIWAL et collaborateurs qui effectuèrent des réactions de fixation du complément selon la technique de KOLMER, mais avec une micro-méthode qui permet d'économiser le matériel antigénique.

B - Résultats

L'ensemble des publications que nous avons pu retrouver concerne plus de 8500 examens sérologiques.

Bien que les réactifs et les conditions opératoires varient considérablement d'un auteur à l'autre, il est possible de dégager une idée

d'ensemble sur la réaction de fixation du complément.

. Spécificité : elle est relativement satisfaisante, bien que des réactions croisées aient été observées par certains auteurs, avec la syphilis ou avec d'autres affections. Par ailleurs, sur environ 5800 sujets non amibiens examinés, 3,7% présentent des réactions faussement positives à des taux généralement bas.

La spécificité est très variable selon les conditions expérimentales puisque chez les sujets normaux, KESSEL (1965) ne relève aucune fausse positivité, alors que celle-ci est de l'ordre de 34,8% pour LIPPI (1952) et même à 46% pour VILLARI (1955).

. Sensibilité : elle est suffisante pour permettre un dosage quantitatif des anticorps, et même éventuellement pour suivre l'évolution sérologique des malades. Dans les réactions positives, les taux sont en général assez modérés : 1/64, 1/128, sauf pour les amibiases hépatiques où des réactions beaucoup plus élevées sont enregistrées (1/2560).

. Valeur diagnostique :

Amibiase intestinale aiguë :

Sur environ 750 cas examinés, 577 présentaient des réactions de fixation du complément positives, soit 76,8%.

Mais là encore, ces moyennes générales ne permettent pas d'apprécier les différences enregistrées d'un auteur à l'autre. C'est ainsi que dans les cas d'amibiases intestinales, on a 90% de réactions de fixation du complément positives pour KESSEL (1965), 55% pour REES et BOZICEVICH (1942), 41% pour MAGATH (1940) et même 15% pour KALISWAL (1966).

Amibiase hépatique ou extra-intestinale :

Dans l'ensemble, elles donnent des résultats beaucoup plus constamment positifs (95,8% des cas), avec souvent des taux très élevés (jusqu'à 1/2560).

. Valeur comme test de guérison : dans l'ensemble de la littérature, nous n'avons pas pu trouver des données suffisamment précises pour pouvoir apprécier l'intérêt de la fixation du complément comme moyen de contrôle thérapeutique et éventuellement comme test de guérison.

Différents auteurs dont CRAIG considèrent cependant qu'un traitement efficace entraîne une négativation de la réaction de fixation du complément, dans un laps de temps assez bref (4 à 8 semaines). Par contre, la persistance de réactions positives traduirait une persistance du parasitisme et pourrait faire craindre une rechute. Ceci semble indiquer que la fixation du complément pourrait présenter un intérêt comme test de guérison, mais nous manquons à l'heure actuelle de résultats suffisamment nombreux pour pouvoir l'affirmer. De toutes façons, la négativation rapide de la sérologie après guérison ne paraît se produire que pour les amibiases intestinales. Dans les formes hépatiques, la réaction semble rester positive longtemps après la guérison.

2° - HEMAGGLUTINATION PASSIVE

Depuis sept ans, cette technique a été appliquée au séro-diagnostic de l'amibiase, avec essentiellement les travaux de KESSEL et ses collaborateurs, WALL et GOLDMAN, MADISSON, POWELL et ELSDON-DEW.

A - Matériel et méthodes

a) L'antigène

Il est préparé à partir de cultures amibiennes très

purifiées et même souvent de souches entretenues sans flore microbienne associée, ou avec un seul type de germe (*Clostridium Welchii*), ou encore avec un parasite (*Trypanosoma cruzi*).

Jusqu'ici, les quelques auteurs qui ont utilisé l'hémagglutination ont pu travailler dans des conditions aussi rigoureuses que possible, ce qui explique la qualité de leurs réactifs et du même coup, l'homogénéité des résultats observés.

A l'inverse, WALL, GOLDMAN et GOGEL ont pratiqué des réactions d'hémagglutination avec un antigène commercial préparé par la méthode de MOAN, et ont pu préciser les résultats très décevants obtenus dans ces conditions.

b) Mode opératoire

Il s'agit d'une classique réaction d'hémagglutination passive ; les variations techniques portent sur l'origine des hématies utilisées (hématies humaines O, Rh positives ou négatives, hématies de mouton ou de lapin), et sur le mode de tannage et de sensibilisation de ces globules rouges.

B - Résultats

On peut apprécier la valeur de l'hémagglutination à partir d'environ 1200 examens sérologiques dont plus de 400 pratiqués chez des sujets témoins.

. Spécificité : dans l'ensemble, la spécificité paraît assez bonne, bien que 8% des sujets témoins donnent des réactions faussement positives mais à des titres peu élevés surtout pour une réaction d'hémagglutination.

. Sensibilité : comme pour toutes les autres applications, l'hémagglutination passive avec antigène amibien bénéficie d'une sensibilité extrêmement élevée (jusqu'à 1/512 000). Cette très grande sensibilité a l'intérêt de permettre une certaine économie de matériel antigénique. Inversement, les premières dilutions et jusqu'au 1/100 - 1/200 ne représentent pas de garanties suffisantes de spécificité. La valeur de cette dilution-seuil varie selon les auteurs et suivant la concentration à laquelle l'antigène est utilisé.

. Valeur diagnostique : on relève plus de 37% de réactions positives chez des porteurs sains, et jusqu'à 68% si ces sujets sont originaires de zones d'endémie amibienne.

Ce résultat est d'ailleurs retrouvé pour toutes les catégories d'amibiase pour lesquelles on observe des réactions plus régulièrement et plus intensément positives si l'examen porte sur des malades vivant en zone d'endémie.

Amibiase intestinale aiguë :

On enregistre ici 94,5% de réactions positives et cela dans pratiquement toutes les études dont nous avons pu prendre connaissance et qui portent au total sur 250 cas environ.

L'hémagglutination passive pourrait donc avoir un gros intérêt dans le diagnostic des formes intestinales. Malheureusement, le fort pourcentage de réactions positives obtenues chez des porteurs sains diminue, dans l'absolu, cette valeur-diagnostique. Cependant, les taux obtenus avec les formes intestinales aiguës sont généralement beaucoup plus élevés sur ceux qui concernent les porteurs de formes minuta.

Amibiase hépatique :

Sur une centaine de cas étudiés par les différents auteurs,

l'hémagglutination s'est révélée positive chez 100% des sujets, et ceci à des taux très élevés, si bien que la valeur-diagnostique est ici très grande.

. Valeur comme test de guérison : d'après KESSEL, dans une étude réalisée par l'hémagglutination et en parallèle par la fixation du complément, la négativation de la sérologie est très lente et l'hémagglutination reste positive cinq, et même vingt trois mois après la guérison. On assiste cependant à une diminution des taux d'anticorps agglutinants. Il semblerait donc que l'hémagglutination reste plus longtemps positive que la fixation du complément.

Cependant, KESSEL n'a pas retrouvé les résultats de CRAIG qui avait obtenu des fixations du complément négatives quelques semaines seulement après guérison.

3° - REACTIONS DE PRECIPITATION

1) PRECIPITIN-TEST DE MOAN

A - Matériels et méthodes

L'antigène est préparé à partir de cultures d'*Entamoeba histolytica*.

Après extraction des fractions antigéniques solubles, une purification complète est effectuée de façon à obtenir un produit parfaitement limpide.

De leur côté, les sérums sont centrifugés à grande vitesse de manière à être débarrassés de toute impureté.

La réaction s'effectue sur des lames microscopiques : à

l'intérieur de cercles de paraffine, on mélange sérum et antigène en quantités équivalentes (0,05 ml), puis les lames sont placées pendant 5 minutes sur un agitateur rotatif. La lecture s'effectue au microscope, une réaction positive se traduisant par l'apparition de micro-précipités.

B - Résultats

. Spécificité : la spécificité de ce précipitin-test est assez relative : aucune réaction croisée n'a été observée avec la syphilis, la tuberculose, les brucelloses, la para-typhoïde A, etc..., mais un pourcentage assez important de réactions positives peut être enregistré chez des sujets non amibiens.

. Sensibilité : elle est suffisante pour permettre le dosage quantitatif des anticorps jusqu'à une dilution maximum de 1/160 des sérums étudiés.

. Valeur diagnostique : dans les cas d'amibiase intestinale aiguë, le test est positif dans environ 90% des cas. Il a été trouvé constamment positif dans cinq cas d'abcès amibiens du foie.

Du point de vue de l'évolution post-thérapeutique, l'auteur a vu des sérologies très positives se négativer en moins d'un an.

Somme toute, ce test de MOAN paraît présenter un intérêt certain pour le diagnostic sérologique de l'amibiase, mais le mode opératoire particulier, et les différentes nécessités techniques qu'il suppose (purification poussée de l'antigène et des sérums examinés), n'ont permis jusqu'ici qu'une diffusion très limitée.

2) PRECIPITATION SIMPLE EN GELOSE SELON LA TECHNIQUE

D'OUCHTERLONY

Les premiers travaux réalisés par cette technique remontent à 1957 (NAKAMURA).

Dans l'ensemble, les différentes recherches peuvent être groupées en deux catégories :

- étude sérologique chez des animaux immunisés avec un antigène amibien
- étude de l'amibiase humaine.

a) Réaction sérologique chez des animaux d'expérience :

Les travaux de NAKAMURA (1957), SEN, GHOSH et MUKERJEE (1961), SIDDIQUI et BALAMUTH (1961) ont essentiellement permis de préciser le nombre et l'importance des fractions non spécifiques présentes dans un antigène préparé à partir de cultures amibiennes.

Ces différents auteurs ont fait réagir des antisérums expérimentaux, face à des extraits préparés à partir de cultures amibiennes, de la flore microbienne associée, ou enfin du milieu de culture.

Là encore, la qualité inégale des réactifs employés, explique les résultats assez discordants.

En effet, SEN, GHOSH et MUKERJEE ont observé des lignes de précipité face à un antigène préparé avec *Escherichia coli* ou avec une souche de pyocyanique.

SIDDIQUI, utilisant des antigènes préparés à partir d'*Entamoeba histolytica*, souches DKB et Laredo, d'*Entamoeba moshkowsky*, d'*Entamoeba invadens*, et deux souches d'amibes non parasites, n'observe pas de réaction croisée entre *Entamoeba histolytica* (souche DKB ou Laredo) et les autres espèces. Par contre, la réaction a pratiquement la même intensité

avec la souche DKB et la souche Laredo, ce qui confirme, comme nous le verrons plus loin, les résultats observés par GOLDMAN en immuno-fluorescence.

NAKAMURA et SIDDIQUI n'observent pas de réactions croisées avec les germes associés. Par contre, NAKAMURA signale de légères réactions de groupe en faisant réagir un sérum anti-Entamoeba histolytica face à un antigène extrait d'Entamoeba coli ou Endolimax nana.

b) Etude sérologique au cours d'amibiases humaines :

Une place assez particulière revient aux travaux de ATCHLEY (1963) qui a effectué des micro-précipitations en gélose à l'aide d'un antigène extrêmement concentré (80 000 000 d'amibes par millilitre).

Cet auteur a étudié une trentaine de sérums humains sans observer de réactions positives avec les sujets témoins. Des lignes de précipité sont obtenues dans tous les cas d'amibiase aiguë, d'abcès du foie, et même chez un porteur de kystes.

Par ailleurs, l'auteur observe jusqu'à 10 bandes de précipité, alors que la plupart des autres études n'ont permis de mettre en évidence que deux ou trois traits.

Comme ATCHLEY l'indique lui-même, ceci s'explique par la très forte concentration de l'antigène utilisé.

Les autres travaux ont été réalisés essentiellement par MADDISON, ELSDON DEW et POWELL travaillant en Afrique du Sud. Etant donné la simplicité avec laquelle la précipitation en gélose est réalisée, ces auteurs ont pu entreprendre de véritables enquêtes épidémiologiques portant au total sur 600 sérums environ.

A - Matériel et méthodes

L'antigène est constitué par des cultures d'*Entamoeba dysenteriae* en présence de *Clostridium welchii*.

Pour la préparation de l'antigène, la densité est de 2 millions de trophozoïtes par millilitre.

B - Résultats

. Spécificité : chez les sujets témoins, on enregistre de 0 à 10% de réactions positives, suivant la race et les conditions de vie (les 10% correspondent à des africains vivant dans des zones hautement endémiques). Avec des affections autres que l'amibiase, le pourcentage de réactions croisées est du même ordre.

Comme cela avait été signalé pour des sérums d'animaux d'expérience, d'importantes réactions croisées sont observées avec des extraits de la flore microbienne associée à la culture d'amibes.

Ces réactions sont particulièrement importantes avec *Clostridium welchii*, qui donne des résultats presque identiques à ceux qui sont obtenus avec l'extrait purifié de cultures amibiennes. Ces réactions non spécifiques disparaissent évidemment si l'on épuise les sérums par de l'antigène *Clostridium welchii*.

Les auteurs ont également utilisé des extraits de différentes souches d'*Entamoeba histolytica* qui semblent donner des résultats sensiblement identiques.

. Sensibilité : la réaction est très peu sensible et permet difficilement de faire un diagnostic quantitatif.

. Valeur diagnostique : la réaction d'OUCHTERLONY est positive dans 88 à 92% des cas d'amibiase intestinale aiguë, et dans plus de

98% des formes hépatiques. Elle paraît donc avoir une valeur diagnostique certaine, bien que 40% des porteurs sains donnent également des résultats positifs.

. Valeur comme test de guérison : les anticorps précipitants semblent persister très longtemps après la guérison, l'évolution post-thérapeutique étant grossièrement identique par la précipitation en gélose et par l'hémagglutination.

Les auteurs sud-africains considèrent que ces deux méthodes ont une valeur comparable sur le plan diagnostique : la technique d'OUCHTERLONY présente un gros intérêt du fait de sa simplicité, inversement, son manque de sensibilité n'en fait pas une technique quantitative.

4) IMMUNO-ELECTROPHORESE

Les travaux concernant cette méthode sont jusqu'ici peu nombreux : GOLDMAN et SIDDIQUI (1965), MADDISON (1965) et KRUPP (1966).

Ils concernent tous l'analyse comparée des propriétés antigéniques de différentes souches d'*Entamoeba histolytica* ou d'autres espèces amibiennes (*Entamoeba invadens*).

Grâce à ses possibilités analytiques, l'Immuno-électrophorèse permettra sans doute une étude antigénique comparée des diverses amibes et peut-être la détermination des espèces qui sont antigéniquement les plus proches d'*Entamoeba histolytica*.

Par contre, cette méthode n'a pas encore été employée à des fins diagnostiques où d'ailleurs, son utilisation risque d'être limitée par la quantité d'antigène nécessaire à la réaction.

II - LES REACTIONS SEROLOGIQUES AVEC ANTIGENES FIGURES

Ces réactions présentent un avantage important qui tient au type d'antigène utilisé. L'emploi d'une suspension parasitaire permet en effet de travailler avec des quantités d'amibes infiniment moins importantes que celles qui sont nécessaires pour la préparation de l'antigène soluble. En outre, cet antigène est bien plus facile à purifier que les extraits solubles.

Mise à part l'immuno-fluorescence que nous envisagerons plus loin, les réactions avec antigènes figurés comportent essentiellement :

- le test d'immobilisation des trophozoïtes
- des techniques d'agglutination de trophozoïtes ou de kystes
- enfin, des réactions d'inhibition du développement en culture ou du pouvoir phagocytaire vis-à-vis des globules rouges.

1° - REACTION D'IMMOBILISATION DES TROPHOZOITES

Inspirée du test de NELSON, cette réaction remonte à 1953, avec les travaux de COLE et KENT.

Depuis lors, elle a donné lieu à une dizaine de recherches qui peuvent être groupées en deux catégories différentes selon qu'elles ont été réalisées à partir d'animaux d'expérience ou à propos d'amibiases humaines.

a) Etude d'immuns-sérums animaux

Ces recherches ont été réalisées par COLE et KENT (1953), BROWN et WITHBY (1955), ZAMAN (1960), SINGH et SINGH (1966), BIAGI, BELTRAN et ORTEGA (1966).

. Mode opératoire : dans l'ensemble, les techniques utilisées sont assez comparables.

L'antigène est préparé à partir d'amibes en cultures qui sont utilisées extemporanément. La réaction s'effectue sur lame en mélangeant une goutte de la suspension d'amibes à une goutte de l'immun-sérum. Ce dernier doit être décomplémenté, sinon il provoque la lyse des parasites. Après une incubation de 30 minutes à 37°, en moyenne, on observe les résultats au microscope à platine chauffante. Pour cela, on numère les amibes qui ont perdu leur mobilité, ce qui se traduit en pratique par un aspect pseudokystique régulièrement arrondi, très différent de l'aspect habituel des amibes vivantes.

Généralement, l'immobilisation ne concerne qu'une partie des parasites et dans l'ensemble, une réaction est considérée comme positive si plus de 50% des amibes sont immobilisées (70% pour BROWN et WITHBY, 100% pour ZAMAN).

Passé un certain délai, un pourcentage variable d'amibes retrouve progressivement sa mobilité ; ceci semble être l'une des difficultés de la méthode, car la lecture de la réaction ne peut se faire que dans un intervalle de temps assez court, autour de la trentième minute. Si l'incubation est insuffisante, le taux des amibes immobilisées n'a pas encore atteint sa valeur maximale. Par contre, si l'incubation est trop longue, on risque d'avoir une remobilisation de certains parasites.

. Résultats : ils concernent essentiellement l'étude antigénique comparée de différentes espèces d'amibes ou de différentes souches d'une même espèce.

C'est ainsi que ZAMAN a étudié cinq souches d'*Entamoeba* invadens, six souches d'*Entamoeba histolytica*, et une souche pour *Entamoeba moshkowskii*, *Entamoeba ranarum* et *Entamoeba coli*.

Il note de légères réactions croisées entre *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba coli*, ou entre *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba invadens*. En ce qui concerne *Entamoeba moshkowskii* et *Entamoeba ranarum*, des réactions croisées très intenses sont obtenues. Enfin, il ne semble pas y avoir de variation suivant la souche pour une espèce donnée. De même, les conditions de culture (variations de température, de milieu, ou modifications de la flore microbienne associée), ne paraissent pas changer le pouvoir antigénique. Par contre, en ce qui concerne les souches d'*Entamoeba histolytica*, des différences antigéniques semblent exister en fonction de la virulence plus ou moins grande de chacune des souches considérées.

SINGH et SINGH (1966) ont étudié dix souches d'*Entamoeba histolytica* et cinq espèces d'amibes libres. Dans tous les cas, des réactions intenses sont obtenues avec les sérums expérimentaux homologues.

Il n'existe pas de réaction croisée entre *Entamoeba histolytica* et les amibes libres. Enfin, les dix souches d'*Entamoeba histolytica* réagissent de façon sensiblement identique.

BIAGI, BELTRAN et ORTEGA (1966) ont mis au point une technique originale qui relève à la fois du test d'immobilisation et de l'immuno-fluorescence. En effet, ces auteurs réalisent des réactions d'immobilisation avec des immuns-sérums préalablement conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine, et la réaction est lue au microscope en lumière ultraviolette. Ceci a permis de préciser certains phénomènes se produisant lors de l'immobilisation par un immun-sérum. On observe en effet, après 30 minutes, lorsque les trophozoïtes s'immobilisent, un précipité fluorescent péri-parasitaire. Puis l'immun-sérum conjugué diffuse, à l'intérieur de l'amibe, dans la totalité du cytoplasme. Après une heure, les 3/4 des parasites commencent à se lyser, les autres concentrent l'immun-sérum fluorescent dans des vacuoles en même temps qu'ils reprennent leur mobilité.

Il semble donc bien que cette remobilisation corresponde à une véritable digestion de l'anti-sérum.

b) Etude au cours d'amibiases humaines

Ces travaux ont été réalisés par COLE et KENT (1953), BROWN et WITHBY (1955), VALENTINO (1956), BIAGI et BUENTELLO (1961), selon une méthode identique à celle qui a été décrite pour l'étude des sérums expérimentaux.

. Spécificité : comme toujours, elle semble assez variable selon que l'on s'adresse à des sujets vivant ou non dans des zones d'endémie amibienne. En effet, chez des sujets témoins, COLE et KENT travaillant à WASHINGTON, n'observent aucune réaction faussement positive, alors que BIAGI à Mexico obtient 15 réactions non spécifiques sur 82 sujets non infestés (18%). Ce dernier résultat correspond d'ailleurs au taux de positivité trouvé par d'autres méthodes chez des sujets considérés comme non amibiens, mais vivant dans une autre zone d'endémie (ELSDON DEW, MADDISON et POWELL en Afrique du Sud).

. Sensibilité : elle est minime, mais on peut éventuellement étudier le sérum à différentes dilutions (jusqu'à 1/16 pour COLE et KENT). Dans l'ensemble, cette réaction est difficilement quantitative.

. Valeur diagnostique : COLE et KENT observent cinq tests d'immobilisation positifs sur 13 sujets amibiens examinés, BROWN et WITHBY en obtiennent 6 sur 25 seulement. Par contre, les résultats de BIAGI semblent beaucoup plus intéressants puisque 90% des amibiases intestinales aiguës (12 cas examinés) donnent des résultats positifs ainsi que 88% des abcès du foie (48 cas examinés).

Par ailleurs, BROWN et WITHBY ont pu, au cours de leur étude, comparer la réaction d'immobilisation et la fixation du complément.

Ils concluent à la plus grande valeur diagnostique du test d'immobilisation qui, par contre, offre l'inconvénient d'une réalisation plus délicate.

. Intérêt comme test de guérison : il est difficile, à l'heure actuelle, de préciser la valeur de la réaction d'immobilisation comme test de guérison. La seule notion que nous possédions est basée sur l'expérience de BIAGI qui, trois mois après le traitement trouve des résultats encore positifs.

2° - AGGLUTINATION DES TROPHOZOITES ET DES KYSTES

a) Agglutination des trophozoïtes :

Elle a été tentée en 1951 par LEAL et AMARAL utilisant comme antigènes des trophozoïtes d'*Entamoeba moshkowsky* en cultures.

Après purification, la suspension parasitaire est mélangée au sérum étudié et mise à incuber une heure à 37°. L'agglutination est observée au microscope.

Cette réaction ne paraît avoir aucune valeur diagnostique.

b) Agglutination des kystes :

Ce test a été imaginé par GREFF en 1950.

Il utilise une culture d'*Entamoeba histolytica* dont l'enkystement est obtenu " in vitro ".

Comme la précédente, cette réaction paraît dénuée de valeur diagnostique.

3° - AUTRES REACTIONS

NAKAMURA en 1959 a proposé une réaction d'inhibition du développement des cultures d'*Entamoeba histolytica* par des immuns-sérums.

SHAFFER et ANSFIELD en 1956, ont essayé d'apprécier l'action des immuns-sérums sur la possibilité qu'ont les amibes de phagocyter les globules rouges.

Ces réactions sont difficiles à réaliser et leurs résultats sont peu probants.

o

o o

III - C O N C L U S I O N

Parmi les réactions sérologiques que nous venons d'envisager, les plus utilisées, c'est-à-dire :

- la fixation du complément
- la réaction d'hémagglutination passive
- la réaction d'OUCHTERLONY
- et le test d'immobilisation

sont sensiblement comparables du point de vue de la spécificité, de la valeur diagnostique et de l'intérêt comme test de guérison.

Seule l'hémagglutination passive présente peut-être des qualités légèrement supérieures. La valeur de ces méthodes dépend essentiellement des réactifs qui ont été utilisés et de l'expérience plus ou moins grande de leurs auteurs.

C'est donc surtout sur le plan de la commodité d'emploi qu'il convient de comparer ces méthodes.

Les réactions avec antigènes solubles présentent en commun des difficultés de préparation et de purification de l'antigène.

Parmi ces réactions, la fixation du complément et la précipitation en gélose ont pour elles leur facilité d'exécution, mais inversement, l'hémagglutination qui est plus délicate à réaliser, offre l'avantage d'avoir

une sensibilité élevée qui lui permet d'économiser le matériel antigénique.

Le test d'immobilisation des trophozoïtes est de réalisation facile et l'obtention de l'antigène ne pose guère de problèmes.

Par contre, il est nécessaire d'entretenir régulièrement une souche d'amibes ; la lecture de la réaction ne semble pas très facile en pratique ; enfin, cette méthode est particulière et n'entre pas dans le cadre d'une réaction polyvalente comme la fixation du complément par exemple.

C'est précisément l'avantage de l'immuno-fluorescence de s'appliquer à de nombreuses parasitoses et de permettre l'emploi d'un antigène figuré.

Chapitre II

RESULTATS OBTENUS JUSQU'ICI PAR L'IMMUNO-FLUORESCENCE APPLIQUEE A L'AMIBIASE

Jusqu'ici, les applications de l'immuno-fluorescence à l'amibiase ont été surtout réalisées par GOLDMAN, dont le premier travail remonte à 1953.

De par son principe même, l'immuno-fluorescence peut être utilisée dans deux buts différents :

- caractérisation d'un antigène figuré à l'aide d'immuns-sérums connus et conjugués à un fluorochrome
- ou bien, diagnostic sérologique en révélant le complexe anti-corps-antigène figuré par un conjugué fluorescent anti-gamma globulines humaines.

1° - UTILISATION DE LA METHODE DIRECTE D'IMMUNO-FLUORESCENCE

Ces recherches ont été presque exclusivement effectuées par

GOLDMAN et son équipe, si on excepte le travail de SIDDIQUI et BALAMUTH (1965) par précipitation en gélose et par immuno-fluorescence directe.

Elles ont donné d'importants résultats aussi bien sur le plan de la technologie qu'à propos de l'étude comparée des propriétés antigéniques des amibes parasites ou non.

A - Mode opératoire

Sauf dans ses tout premiers essais, GOLDMAN effectue ses réactions d'immuno-fluorescence sur lames microscopiques.

L'antigène est constitué par des suspensions d'amibes de cultures qui sont réparties à raison d'une goutte par lame.

Une fois séchées, ces préparations sont fixées par le méthanol ou le formol puis traitées par les antisérums fluorescents.

La lecture de la réaction s'effectue au microscope à lumière ultra-violette et même, afin d'obtenir des résultats plus précis et moins subjectifs, à l'aide d'un micro-fluorimètre qui permet de mesurer la fluorescence des parasites.

B - Résultats

. Spécificité : dès le départ, GOLDMAN a pu mettre en évidence la grande spécificité de l'immuno-fluorescence puisqu'aucune réaction positive n'est observée avec des sérums de lapins immunisés contre la flore microbienne associée.

. Comparaison antigénique de diverses espèces ou souches d'amibes : dans ce but, GOLDMAN a étudié des immuns-sérums de titres très élevés qu'il a même, dans certains cas, purifiés par absorption sur des trophozoïtes provenant d'autres espèces d'amibes que celles correspondant à l'immun-sérum. L'auteur a pu ainsi montrer qu'il n'existait que des communautés antigéniques très faibles ou même nulles entre *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba invadens*, *Endolimax nana*, *Entamoeba moshkowskyi* et *Entamoeba hartmanni*.

Ce dernier résultat est particulièrement intéressant car il apporte un argument sérologique à l'individualisation de l'espèce *Entamoeba hartmanni*, dont certains auteurs avaient fait une forme particulière d'*Entamoeba histolytica*.

A l'intérieur de l'espèce *Entamoeba histolytica*, des variations antigéniques sont enregistrées selon le stade évolutif. C'est ainsi qu'un sérum anti-*histolytica* ne réagit que faiblement avec les formes minuta. En outre, des différences très nettes peuvent être observées suivant les souches d'amibes histolytiques : l'activité antigénique des formes peu pathogènes étant assez faible face à des immuns-sérums préparés à partir de souches plus virulentes.

En dehors de cette comparaison antigénique de diverses amibes, les travaux de GOLDMAN laissent donc espérer la possibilité d'un véritable séro-typage des souches d'*Entamoeba histolytica*. Ceci se heurte sans doute à de grosses difficultés matérielles, mais cette étude pourrait présenter un très grand intérêt, étant donné la virulence très inégale des amibes de type histolytique.

C'est ainsi que, par exemple, il est classique de considérer que l'amibiase est beaucoup plus grave en Extrême-Orient et en Afrique du Sud (DURBAN), que dans d'autres pays d'endémie.

Il est donc possible que, par analogie avec ce qui est observé avec *Escherichia coli*, *Entamoeba histolytica* ait un pouvoir pathogène

variable selon les souches, ce qui justifierait l'identification des parasites, non seulement par des critères morphologiques, mais aussi par un séro-typage.

2° - UTILISATION DE LA METHODE INDIRECTE : SERO-DIAGNOSTIC DE L'AMIBIASE HUMAINE.

Nous n'avons retrouvé que trois études réalisées jusqu'ici par l'immuno-fluorescence indirecte : celles de JEANES en 1964 et 1966 , puis de GOLDMAN (1966).

Pour mieux les comparer à nos propres résultats, nous envisagerons ces travaux séparément et de façon relativement détaillée.

A - JEANES (1966) : L'immuno-fluorescence indirecte dans le ----- diagnostic de l'amibiase hépatique -----

a) Matériel et méthodes

L'antigène est préparé à partir d'une souche virulente d'*Entamoeba histolytica* entretenue sur milieu de Dobbel (repiquage tous les deux ou trois jours). Pour préparer les étalements, les amibes sont prélevées avec une pipette PASTEUR au fond du tube de culture , et lavées à deux reprises dans une solution de Ringer modifiée. La concentration finale est ramenée à 5000 amibes par mm³. Des gouttes de cette suspension sont déposées sur des lames microscopiques qui sont rapidement séchées sur platine chauffante à 56°. Ces préparations sont conservées à -20°. Les sérums sont étudiés aux dilutions : 1/8, 1/16, 1/32 etc... Le conjugué fluorescent antigamma globulines humaines (dont l'auteur ne précise pas la provenance) est employé

à la dilution de 1/128.

La réaction est effectuée pendant 30 minutes en atmosphère humide à 37° (action des sérums étudiés). Après un lavage de 10 minutes dans du tampon, les préparations sont séchées et recouvertes de conjugué fluorescent. Elles sont à nouveau placées pendant 30 minutes à 37° en chambre humide ; puis on les lave dans un bain de tampon durant 10 minutes, et on réalise une contre-coloration dans une solution de bleu d'Evans à 0,05% pendant 10 minutes.

Cette contre-coloration paraît d'ailleurs avoir été appliquée à l'amibiase pour la première fois par GOLDMAN (communication personnelle en 1965).

Les lames sont lavées une dernière fois, puis recouvertes d'une lamelle montée sur une goutte de glycérine tamponnée.

La lecture est effectuée avec un microscope Reichert-Zétopan pourvu d'un condensateur à fond noir ; filtre d'émission : Schott UG1/1,5 mm ; filtre d'arrêt : Wratten 2 B.

b) Résultats

Cette étude encore préliminaire porte sur 204 sérums dont 196 prélevés chez des sujets témoins :

Pour ceux-ci, on observe 16 réactions positives à 1/16, les 180 autres sérums n'étaient positifs qu'à 1/8 au maximum.

Dans les 8 cas d'abcès du foie, la réaction est constamment positive. On note un cas positif à 1/64, 3 cas positifs à 1/128, et 4 cas positifs respectivement à 1/512, 1/1024, 1/2048 et 1/16 384.

Par ailleurs, l'auteur ne mentionne aucun résultat concernant l'évolution de la sérologie après traitement.

B - GOLDMAN (1966) : Etude de l'amibiase par une méthode

d'immuno-fluorescence employant comme antigènes deux souches

différentes d'*Entamoeba histolytica*

1) MATERIEL ET METHODES

a) l'antigène

. Origine : l'antigène est obtenu à partir de deux souches très différentes d'amibes histolytiques.

La première souche (K9) a été isolée en 1951 chez un dysentérique venant de Corée. Très pathogène pour le cobaye cette souche est entretenue à 35° sur un milieu diphasique : phase solide à l'oeuf, phase liquide constituée d'une solution de Locke et d'amidon de riz. La nature de la flore microbienne associée n'est pas précisée.

La deuxième souche (souche HUFF) provient d'un porteur sain. Elle a été testée sur 83 volontaires et ne paraît que peu pathogène pour l'homme alors qu'elle l'est encore très légèrement pour l'animal. En dehors du pouvoir pathogène, la souche Huff semble très différente de la souche K9 sur le plan antigénique et au point de vue de ses caractères culturels. En immuno-fluorescence directe, elle ne réagit que faiblement avec des immuns-sérums anti-K9. Sa culture peut être réalisée aussi bien à 25° qu'à 35° et elle peut s'enkyster in vitro dans un milieu très pauvre (milieu de culture habituel dilué au 1/64 dans de l'eau distillée).

D'une manière générale, la souche Huff est cultivée dans les mêmes conditions que la souche K9.

. Préparation : elle exige au moins deux tubes de culture de 48 heures. Dans chaque tube, on recueille le sédiment qui est dilué avec 10 ml de sérum physiologique ; puis le mélange est laissé quelques

instants à la température ambiante. Les diverses impuretés (amidon, etc...) sédimentent et sont écartées avec une pipette Pasteur. Le surnageant est centrifugé à 1500 tours/minute pendant 5 minutes. Le culot de cette centrifugation est remis en suspension dans 5 ml de formol à 10% dans du tampon. Cette fixation se poursuit pendant 30 minutes à la température ordinaire, puis on élimine les débris qui auraient pu de nouveau sédimenter. On lave dans du sérum physiologique comme précédemment, puis on neutralise le formol en mettant en suspension le culot de la dernière centrifugation dans 1 ml d'une solution d'ammoniaque à 1%. Après un nouveau lavage, on ajoute au centrifugat 1 ml de Tween 80 à 3%, qu'on laisse agir 5 minutes, puis on centrifuge. Le culot de cette dernière centrifugation est remis en suspension dans autant de fois 1 ml de sérum physiologique qu'on a utilisé au départ de tubes de culture.

A chacune des étapes de cette préparation, on vérifie au microscope l'état et le nombre des amibes. La suspension finale montre, au microscope à faible grossissement, 20 à 40 amibes par champ et une quantité minime d'impuretés.

Cette technique de préparation de l'antigène dérive de la méthode de MAESTRONE. Bien que relativement compliquée, elle présente d'après GOLDMAN d'importants avantages. En effet, préparés de cette manière, les trophozoïtes montrent une fluorescence beaucoup plus intense et surtout beaucoup plus constante d'un élément à l'autre. Par ailleurs, cette méthode permet une meilleure conservation : un mois à + 4°, sous forme de suspension, au lieu de 15 jours seulement, à la même température, lorsqu'on utilise des amibes simplement formolées.

b) Les sérums étudiés

Les 92 sérums analysés par GOLDMAN provenaient d'américains dont certains avaient résidé Outre-Mer. Quelques-uns de ces sérums ont été conservés plusieurs années à -20° sans que GOLDMAN note une baisse importante de leur taux d'anticorps.

Tous ces sérums ont été étudiés après dilution à 1/16, 1/64, etc...

En ce qui concerne les contrôles parasitologiques chez les sujets examinés, ils ont été effectués de façon répétée et par des laboratoires qualifiés.

c) conjugué fluorescent

L'auteur a employé un conjugué commercial (Microbiological Associates lot 22 460), dilué dans du tampon véronal à pH 7,5 contenant 2,5% d'albumine bovine. La dilution optimale du conjugué varie selon le type d'antigène :

- 1/512 à 1/1024 avec la souche Huff
- 1/128 à 1/256 pour la souche K9.

d) Installation microscopique

- Microscope binoculaire équipé d'un condensateur à fond noir, d'un brûleur à vapeur de mercure 200-3 dans une lampe Leitz.
- Filtre d'émission SCHOTT BG 25/3mm.
- Filtre d'arrêt WRATTEN n° 12.

e) Exécution de la réaction

On utilise des lames dont la surface est siliconée à l'exception de petits cercles de 1 cm².

Au moment de la réaction, on dispose dans chaque cercle une goutte de la suspension amibienne. Après séchage, les lames sont lavées à l'eau pendant 5 minutes, puis séchées à nouveau.

On dépose alors sur chaque étalement une goutte des dilutions des différents sérums étudiés et on laisse réagir à 35° en chambre humide pendant une heure. Les lames sont alors lavées 10 minutes dans du

sérum physiologique, rincées à l'eau et séchées. On dépose sur les préparations une goutte de conjugué fluorescent pris à la dilution optimale et on laisse réagir dans les mêmes conditions que pour les sérums. Les lames sont lavées comme précédemment, puis plongées dans un bain de bleu d'Evans à 0,1% dans de l'eau distillée. A l'issue de cette contre-coloration, on rince à l'eau puis on lave pendant 10 minutes dans du tampon phosphate à pH 7,3 et on rince à nouveau à l'eau. Les lames sont enfin séchées et les étalements recouverts d'une lamelle montée sur glycérine tamponnée.

f) Lecture des résultats

Dans les réactions négatives, les amibes sont uniformément colorées en rouge. En cas de réactions positives, les trophozoïtes présentent une fluorescence globale jaune-verte si la réaction est intense ; si elle est faible, seule la périphérie des parasites est jaune-verte, alors que le centre est coloré en rouge.

2) RESULTATS

- Avec la souche Huff, les résultats sont dans l'ensemble très décevants, comme c'était logique avec une souche antigéniquement peu active.

- Avec la souche K9 :

. Spécificité : elle n'est pas absolue si l'on retient comme dilution initiale le 1/16 ; en effet, sur les 17 sérums témoins examinés, 11 étaient négatifs, mais 4 ont été trouvés positifs à 1/16 et 2 à 1/64.

. Sensibilité : elle paraît assez élevée puisque certains taux atteignent 1/1024.

. Valeur diagnostique :

a) Amibiases intestinales aiguës :

Sur 26 cas examinés, GOLDMAN a relevé trois résultats négatifs, cinq positifs à 1/16, onze à 1/64, quatre à 1/256 et trois à 1/1024.

b) Amibiases asymptomatiques :

Sur 6 cas examinés, GOLDMAN a trouvé deux résultats négatifs, trois positifs à 1/16, 1 à 1/64.

c) Porteurs sains :

Sur 20 sujets examinés, neuf sérologies sont négatives, sept sont positives à 1/16, quatre à 1/64.

d) Amibiases hépatiques (22 cas) et cutanée (1 cas) :

Deux sérologies sont négatives, sept sont positives à 1/16, neuf sont positives à 1/64, deux à 1/256 et trois à 1/1024.

Dans l'ensemble, la valeur diagnostique de la méthode est donc loin d'être absolue, surtout si l'on considère que le taux de 1/16 n'est pas strictement significatif puisqu'il est retrouvé chez quatre sujets témoins sur dix-sept.

D'ailleurs, dans quatre cas d'amibiase (dont un abcès du foie) trouvés négatifs en immunofluorescence, l'hémagglutination pratiquée en parallèle a donné des résultats positifs.

. Valeur comme moyen de contrôle post-thérapeutique :

L'auteur n'apporte aucune précision à ce sujet.

Chapitre III

T R A V A U X P E R S O N N E L S

Depuis 1964, nous nous sommes efforcé d'adapter la technique d'immuno-fluorescence et de mettre au point une méthode simple et reproductible. Progressivement, différentes améliorations techniques ont pu être obtenues, dont certaines grâce aux conseils personnels de GOLDMAN. Nous disposons aujourd'hui d'une technique qui, employée régulièrement chaque semaine, nous a permis d'effectuer plusieurs centaines d'examens sérologiques.

Avant d'analyser les résultats obtenus, nous considérerons successivement :

- l'étude expérimentale (mise au point de la réaction)
- la technique proposée.

o

o o

I - ETUDE EXPERIMENTALE

La mise au point de la réaction a nécessité un certain nombre d'essais à propos du matériel utilisé :

- l'antigène
- les sérums à tester
- les conjugués
- la contre-coloration.

A - L'antigène

C'est essentiellement à propos de l'antigène, de son obtention, de sa purification, et de ses conditions de conservation que nous avons rencontré les principales difficultés.

Nous avons employé deux types de préparation antigénique :

- des étalements sur lames d'amibes de culture (c'est l'antigène que nous avons utilisé en pratique)
- des coupes à la congélation de caecums de rats inoculés expérimentalement.

1) LES ETALEMENTS SUR LAMES D'AMIBES DE CULTURE

1° - ORIGINE : LES SOUCHES UTILISEES

Nous avons employé parallèlement trois souches différentes

d'Entamoeba histolytica isolées au Laboratoire :

- la souche AS isolée en 1954, à partir d'un malade hospitalisé à l'Hôpital Militaire Desgenettes pour une amibiase aiguë, contractée en Extrême-Orient

- la souche W isolée en 1964 chez un amibien présentant une rechute d'amibiase chronique

- enfin, la souche NS que nous n'avons employée qu'occasionnellement et à titre comparatif. Elle a été isolée en 1965.

2° - CONDITIONS HABITUELLES D'ENTRETIEN

La culture est effectuée à 37°.

a) La souche AS :

est entretenue depuis 13 ans sur le milieu diphasique pour protozoaires de l'Institut Pasteur et parallèlement sur milieu à la gélose asparagine.

. Le milieu de l'Institut Pasteur dérive du milieu de Dobbel (1926) et comporte comme phase solide du sérum de cheval coagulé à la chaleur. La phase liquide, livrée en ampoules de 5 ml, contient du sérum de cheval à 10% dans du liquide de Ringer et de l'amidon. On peut se le procurer facilement dans le commerce (1).

. Milieu à la gélose asparagine (TANABA et CHIBA, 1928) : la phase solide est fabriquée à partir de 10 grammes de gélose dilués dans un litre de liquide de Ringer auquel on ajoute un gramme d'asparagine. La phase liquide est constituée de sérum de poulain à 10% dans du liquide de Ringer auquel on ajoute un peu d'amidon.

(1) *Milieu pour Protozoaires de l'Institut Pasteur de Paris, 25 rue du Docteur Roux - 75 - Paris - 1507*

Très récemment, nous avons tenté avec succès d'enrichir ce milieu en lui ajoutant de petites quantités d'un hydrosol polyvitaminé du commerce.

Les repiquages sont effectués tous les 8 jours.

Pour cela, on prélève avec une pipette Pasteur le sédiment présent au fond du tube à la limite de la phase solide. Une goutte de ce prélèvement est examinée au microscope ordinaire à faible grossissement de manière à contrôler la vitalité de la souche. Puis, on ensemence des tubes de milieu neufs qui ont été préalablement réchauffés au bain-marie à 37°. La quantité ensemencée est, pour chaque nouveau tube, de 0,5 ml, mais cette quantité peut varier en fonction de la richesse de l'inoculat. Il y a là un optimum assez difficile à réaliser : si la quantité ensemencée est insuffisante, on risque de perdre la souche, si, au contraire, on ensemence trop abondamment, la flore microbienne associée prend un développement exagéré et inhibe la pousse des amibes.

En pratique, et pour limiter les risques de perte de la souche, on ensemence deux tubes de culture le lundi, et deux autres le jeudi. Chaque lot de deux tubes est ensuite repiqué tous les huit jours. On dispose ainsi chaque semaine de deux séries différentes, ce qui constitue une sécurité. Pour la production de l'antigène, on est évidemment amené à multiplier les tubes de cultures. L'expérience montre que, à partir d'un tube de culture de huit jours, on peut, au maxima, ensemencer quatre nouveaux tubes.

En dehors des amibes, chaque tube présente une flore microbienne associée, abondante et complexe. Elle comprend des bacilles pyocyaniques, des protéus et des *Escherichia coli*.

b) Les souches W et NS :

sont entretenues uniquement sur gélose asparagine, à la même température et avec le même rythme de repiquage que pour la souche AS.

3° - ESSAIS DE CULTURE SUR MILIEU ENRICHI

La préparation de l'antigène suppose que l'on ait des cultures très riches en amibes et ne comportant que le moins possible de flore microbienne ou d'éléments étrangers. C'est pourquoi nous avons essayé d'adapter nos différentes souches à de nouveaux milieux de culture.

. Milieu de l'oeuf coagulé : ce milieu est celui qui a été le plus utilisé par les différents auteurs. Décrit par DESCHIENS en 1927, il dérive des milieux de BOECK et DRBOHLAV. Sa préparation est la suivante :

Phase solide : oeuf total émulsionné avec 10% de sérum physiologique et coagulé à 80° pendant une heure.

Phase liquide : une partie de blanc d'oeuf pour neuf parties de sérum physiologique.

On peut y rajouter des éléments figurés (amidon, broyat de foie).

Nous avons utilisé ce milieu à l'oeuf non pas pour l'entretien régulier de la souche, mais de façon transitoire pour obtenir un enrichissement. Pour préparer l'antigène amibien, nous avonsensemencé plusieurs tubes de milieu à l'oeuf, à partir des milieux d'entretien habituels.

Dans l'ensemble, les résultats ont été assez décevants : sous l'effet de l'importante flore microbienne associée, environ un tube de milieu à l'oeuf sur deux était littéralement putréfié avant qu'une richesse suffisante en amibes n'ait pu être obtenue.

. Milieu à l'oeuf additionné d'antibiotiques et de ATP : nous inspirant de différents essais réalisés à l'étranger, nous avons plus récemment tenté d'additionner le milieu à l'oeuf d'antibiotiques et de facteurs de croissance. Dans un premier temps, nous ajoutons à chaque tube 50 000 unités de

pénicilline et 0,05g de streptomycine, puis 1 mg d'ATP et 10 mg de pyridoxine (Myoviton LABAZ).

Les résultats ont été ainsi très sensiblement améliorés : diminution de la flore microbienne associée, et obtention de cultures amibiennes plus riches que celles qui étaient obtenues avec les milieux habituels.

Des résultats plus réguliers et plus satisfaisants nous ont été donnés en ajoutant 10 mg de chloramphénicol aux tubes de culture en plus de l'association pénicilline-streptomycine et des facteurs de croissance.

Malgré ces améliorations, l'emploi du milieu à l'oeuf ne se justifierait pas si l'on considérait uniquement la richesse accrue de la culture. C'est essentiellement pour des raisons de purification que nous continuons à l'utiliser dans certains cas. En effet, comme nous le verrons plus loin, il est nécessaire de purifier la culture et d'en éliminer les éléments étrangers avant de préparer l'antigène. Pour la souche AS, cette purification est facilement obtenue avec les milieux de l'Institut Pasteur qui sont donc régulièrement utilisés. Pour les deux autres souches, que nous n'avons employées d'ailleurs qu'occasionnellement à titre de comparaison, la purification est très difficile après culture sur les milieux d'entretien habituels. C'est pourquoi, pour préparer l'antigène, nous faisons passer ces souches sur milieu à l'oeuf.

4° - LA PREPARATION DE L'ANTIGENE

a) Date de prélèvement

Les amibes sont prélevées après six jours de culture quel que soit le milieu utilisé. Avant le sixième jour, la richesse est insuffisante, au contraire, après une semaine de culture, la flore microbienne prend un développement exagéré, et si les amibes sont apparemment plus nombreuses qu'au sixième jour, un certain nombre d'entre elles sont mortes et le milieu est trop pollué pour être facilement purifié.

b) Purification

C'est là le temps le plus délicat de la préparation de l'antigène : il faut respecter en effet deux impératifs.

- . Eliminer les éléments non parasitaires, c'est-à-dire :
 - les germes microbiens
 - les éléments figurés de la culture (amidon de riz et débris de la phase solide)
 - les différentes impuretés
 - les antigènes solubles qui pourraient être libérés dans le milieu de culture
 - les différentes protéines présentes dans ce milieu.

. Et en même temps, les opérations de purification doivent être aussi peu traumatisantes que possible pour les amibes.

Celles-ci doivent être retrouvées pratiquement intactes sinon elles adhèrent mal aux lames microscopiques et leur identification est difficile lors de la lecture des résultats.

Les germes et les différentes impuretés solubles sont facilement éliminés, le problème le plus délicat concerne les éléments figurés car les grains d'amidon de riz présentent sensiblement la même densité que les amibes.

Avant d'en arriver à la technique que nous employons habituellement, nous avons essayé successivement :

- l'action de la ptyaline
- la sédimentation simple.

. Action de la ptyaline : quelques essais ont été réalisés avec de la ptyaline dans le but d'obtenir une dégradation " in vitro "

des grains d'amidon. Dans l'ensemble, cette opération exigeait deux heures environ. Elle entraînait une disparition quasi totale des grains d'amidon, mais altérait les amibes qui constituaient un antigène peu satisfaisant.

. Sédimentation : comme GOLDMAN, nous avons essayé de purifier nos cultures par simple sédimentation. Pour cela, les amibes sont prélevées par une pipette Pasteur au fond du tube de culture, puis placées dans 10 mm³ environ de sérum physiologique tiédi. Le mélange est abandonné à la température ordinaire pendant un temps plus ou moins long. Contrairement à ce qu'a observé GOLDMAN, avec ses souches et ses milieux de culture, nous avons obtenu dans nos sédiments une quantité importante de grains d'amidon qui semblent avoir la même densité que les amibes. Ce procédé d'enrichissement ne nous a donc pas semblé suffisant malgré plusieurs essais réalisés en faisant sédimenter plus ou moins longtemps dans des tubes de diamètre et de hauteur variables.

. Technique personnelle : elle est basée sur la constatation que, avec certaines souches, et certains milieux, les grains d'amidon lorsqu'ils sont présents en très grand nombre, ont tendance à flocculer et à former des agrégats qui peuvent être facilement éliminés. La technique de purification que nous avons mise au point est utilisable pour la souche AS sur milieu de l'Institut Pasteur. Quant à la souche W, elle donne à partir de ce milieu des résultats moins nets. Pour la souche NS, aucune floculation n'est obtenue. Pour cette dernière souche, on utilise donc le milieu à l'oeuf (sans addition d'amidon) car la petite quantité d'amidon de riz apportée avec l'inoculat suffit à la prolifération (il s'agit d'obtenir une survie de huit jours et non pas une culture régulière). Dans ces conditions, la purification de la souche NS est facilement réalisée car il n'y a pratiquement plus d'amidon à éliminer, celui-ci s'étant épuisé.

Dans les autres cas (souche AS ou W) la méthode de purification est la suivante :

- le sédiment de la culture est mis en suspension dans

10 ml de liquide de Ringer tiédi contenu dans un tube à centrifuger conique. Le mélange est immédiatement centrifugé pendant une à deux minutes à 1000 tours-minute. Le culot de centrifugation est alors remis en suspension dans une ou deux gouttes de liquide de Ringer. On voit apparaître rapidement des agglomérats volumineux de 0,1 à 1 mm de diamètre environ et l'on ajoute 10 ml de liquide de Ringer tiédi. Cette addition doit être faite avec beaucoup de précaution, de façon à ne pas dissocier les agglomérats déjà formés. On laisse reposer une à deux minutes à la température ordinaire, et l'on voit les agglomérats sédimenter rapidement en " flocons de neige ", alors que la majorité des amibes reste en suspension dans le surnageant. Celui-ci est centrifugé à nouveau comme précédemment et le culot obtenu peut subir encore deux à trois fois le même traitement. A la fin, on obtient un culot contenant très peu d'amidon et beaucoup d'amibes. Quant aux germes, aux impuretés de petite taille et aux éléments étrangers solubles, ils ont été éliminés au cours des différents lavages.

Par dilution dans du sérum physiologique, on amène alors la concentration finale à environ 100 000 parasites par ml. A partir de 1 ml de cette suspension, on peut réaliser 50 à 60 étalements c'est-à-dire suffisamment de matériel antigénique pour étudier 10 à 12 sérums à 5 dilutions différentes. On obtient généralement 1 ml de suspension à partir de chaque tube de culture au sixième jour.

5° - PREPARATION DES ETALEMENTS - SILICONAGE DES LAMES

Les étalements antigéniques sont réalisés sur des lames microscopiques, en verre ordinaire, de moins de 1 mm d'épaisseur. Pour simplifier la manipulation, nous avons été amenés à réaliser cinq étalements par lame, ce qui permet donc avec une seule lame, d'étudier un sérum aux dilutions 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800. Pour éviter qu'au cours de la manipulation, des mélanges ne se produisent entre les gouttes des différentes dilutions, nous avons dû siliconer les lames. La technique est la suivante :

Sur des lames microscopiques de 0,8 à 1 mm d'épaisseur, on grave au diamant cinq cercles de 7 à 8 mm de diamètre environ, régulièrement espacés, et un numéro d'ordre placé dans le coin supérieur droit. Les lames sont parfaitement nettoyées avec de l'alcool-éther, puis on couvre la surface des cercles avec du vernis à ongles utilisé pur ou en solution à 1/4 environ dans l'acétone. On laisse sécher à la température ordinaire.

Le siliconage proprement dit a d'abord été réalisé à l'aide de Rhodorsil 240 (1) dilué au 1/3 dans de l'éther de pétrole. On badigeonne les deux faces des lames au pinceau avec ce mélange qu'on laisse agir 5 minutes, puis on rince soigneusement à l'éther et à l'eau. Le vernis à ongles est alors enlevé soit à l'acétone, soit de préférence par raclage, à l'aide d'une autre lame microscopique.

Depuis un an environ, nous avons préféré employer pour le siliconage, le Siliclad (2) qui est d'un maniement beaucoup plus commode que le Rhodorsil 240 (produit ininflammable, soluble dans l'eau, ne produisant pas de vapeurs toxiques) ; les lames préparées comme précédemment, sont plongées pendant 5 à 10 secondes dans une solution de Siliclad à 2% dans de l'eau distillée, préparée extemporanément, et rincées soigneusement à l'eau pour éliminer l'excès de produit. La polymérisation des silicones est obtenue, soit après 24 heures à la température ordinaire, soit, comme nous le faisons habituellement, en 10 minutes au four Pasteur à 100°.

Comme précédemment, le vernis à ongles est enlevé par raclage, et après un nouveau lavage à l'eau, les lames sont prêtes à l'emploi. Ce siliconage persiste pendant plusieurs réactions, dans la mesure où le lavage n'est pas effectué trop brutalement (éviter l'emploi des détergents trop actifs).

(1) PROLABO

(2) Fabriqué par CLAY-ADANS, New-York, représenté en France par PARIS-LABO.

. Confection des étalements : la suspension purifiée d'amibes (100 000 parasites par ml) est répartie sur les lames à raison de une goutte dans chaque cercle. On laisse reposer quelques instants de manière à ce que les amibes puissent sédimenter et entrer en contact avec le verre. Les lames qui sont disposées horizontalement sur des portoirs en bois sont alors soumises à une vibration latérale (il suffit pour cela de frapper très légèrement de façon répétée sur le montant des portoirs). Ceci a pour effet de rassembler les éléments figurés au centre de chaque cercle, ce qui permet une lecture plus facile. Les lames sont rapidement séchées à l'étuve à 37° où l'on place un ventilateur.

6° - CONSERVATION

Elle présente évidemment un très grand intérêt pratique, puisque la fabrication de l'antigène est relativement longue et délicate. Jusqu'ici nous avons employé deux types de conservation :

a) Conservation par le froid

Les étalements sur lames, séchées mais non fixées, peuvent être directement conservés :

- à + 4°C pendant quelques jours
- à -20°C pendant un mois environ
- à -196°C dans un container d'azote liquide, de façon pratiquement indéfinie.

Des essais répétés nous ont permis de vérifier que dans les limites de temps indiquées, ces différents modes de conservation n'entraînent pas de variation de l'activité antigénique.

b) Conservation sous forme de suspensions lyophilisées :

Nous avons été amené à l'utiliser très récemment en nous inspirant des résultats obtenus par Madame A. CORNET pour la toxoplasmose. Nous avons donc utilisé sa technique qui dérive d'ailleurs de celle de TAKUMI et collaborateurs.

La suspension d'amibes purifiée est fixée par l'addition d'une quantité égale de formol à 10% dans du tampon à pH 7,2 qu'on laisse agir 30 minutes. Puis, par centrifugation, pendant deux minutes à 1000 tours-minute, on recueille les amibes et le surnageant est écarté. Les parasites sont lavés à deux reprises dans une solution de saccharose à 5%, le culot de la dernière centrifugation étant remis en suspension dans une quantité de saccharose suffisante pour que la concentration finale soit de 100 000 parasites par ml. On répartit cette suspension dans des flacons de type pénicilline qui subissent une pré-congélation à -25° pendant 15 minutes, suivant la technique " à la coquille " ; on branche alors les flacons sur l'appareil à lyophiliser (VIRTIS 10-146 MR-BA. Température du condensateur -45°, vide de -100 microns de mercure, durée de lyophilisation 1/2 heure environ). A l'issue de cette opération, les flacons sont immédiatement bouchés. Ils peuvent être conservés soit à la température ordinaire, soit de préférence à la glacière à +4°. Cette conservation est sans doute pratiquement indéfinie tant que les flacons ne sont pas ouverts, mais notre expérience actuelle ne porte que sur quelques mois.

Au moment de l'emploi, on remet les amibes en suspension dans un volume d'eau distillée égal au volume initial, puis on les lave à deux reprises dans du tampon pH 7,2 de manière à éliminer la saccharose. Avec la suspension ainsi reconstituée, on peut alors préparer les étalements comme précédemment. Une fois secs, ces étalements peuvent à nouveau être conservés au froid. Ils sont directement prêts à l'emploi.

Les résultats, en ce qui concerne aussi bien la durée de conservation que l'aspect des amibes, sont très comparables et même supérieurs à ceux obtenus avec la conservation en azote liquide. Sur le plan

pratique, la lyophilisation présente beaucoup moins de difficulté et de sujétions que l'usage régulier d'un congélateur à azote liquide.

2) LES COUPES A LA CONGELATION DE CAECUMS DE RATS INFESTES

----- EXPERIMENTALEMENT -----

Nous avons utilisé :

- des caecums de rats que nous avons inoculés au laboratoire par voie intra-caecale, avec la souche NS. Ces tentatives d'inoculation ne nous ont pas donné de résultats satisfaisants, la plupart des animaux mourant d'une infection microbienne d'ue à l'abondance des germes présents dans la culture, malgré l'administration d'antibiotiques.

- des caecums de rats inoculés au Laboratoire de Parasitologie du Professeur GOLVAN au C.H.U. Saint-Antoine (Dr. HOUIN et Dr. GARGOURI). Nous avons reçu les rats vivants. Immédiatement après leur prélèvement, les caecums ont été congelés sans fixation préalable.

- des caecums de rats infestés dans les Laboratoires de la Société CIBA à Bâle (Service du Docteur C.R. LAMBERT, Madame RAWEWAN JARUMILINTA). Ce matériel nous a été adressé fixé dans le formol à 2%.

A partir de ces organes, nous avons préparé des coupes à la congélation de 5 microns d'épaisseur (1). Ces coupes sont fixées sur lames par simple apposition, et peuvent être conservées pour quelques semaines au congélateur à -20°.

En utilisant ce type de matériel antigénique, nous espérons éviter les difficultés que supposent les étalements sur lames d'amibes de cultures. Malheureusement, les coupes à la congélation ne nous ont donné

(1) *BRIGHTS Cryostat F. Masson, Bruxelles.*

que des résultats décevants jusqu'ici. Les caecums formolés donnent des coupes qui ont tendance à se décoller. Dans une certaine mesure, ceci peut être évité en plongeant les caecums pendant 24 heures dans une solution d'ammoniaque à 1% de façon à neutraliser le formol avant de réaliser les coupes. Au contraire, le matériel congelé sans fixation préalable nous a fourni des coupes adhérant parfaitement aux lames. Dans tous les cas cependant, ces coupes ne nous ont pas donné de réactions satisfaisantes : on observe seulement quelques rares amibes difficiles à identifier. Ceci rend donc très difficile la lecture surtout en cas de réaction négative. Compte tenu de ces résultats, c'est donc uniquement à partir d'amibes de cultures que nous avons effectué nos réactions d'immuno-fluorescence.

B - Les sérums à tester

La majorité d'entre eux a été prélevée à LYON, mais quelques-uns nous ont été adressés par des correspondants d'Outre-Mer. Immédiatement après décantation, on a ajouté à ces sérums une solution d'azide de sodium à 1% à raison d'une goutte par millilitre de sérum. Jusqu'à ce qu'ils nous soient envoyés par avion, ces prélèvements étaient sur place conservés à +4° (quelques jours généralement). Au Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de LYON, ces sérums étaient immédiatement répartis dans plusieurs tubes différents, puis placés au congélateur à -20°. Ce type de conservation n'est pas parfait puisqu'après six mois, nous avons pu observer pour certains sérums, une chute du taux des anticorps d'une dilution.

Tous ces sérums ont été étudiés quantitativement aux dilutions 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, etc... Les contrôles de spécificité, que nous envisagerons plus loin, nous ont montré que la première dilution significative était de 1/50.

C - Les conjugués

Au cours de notre étude, nous avons utilisé différents types de conjugués. Certains nous ont été adressés par les Docteurs NIEL, et FRIBOURG-BLANC de Paris, d'autres sont des produits commerciaux (BD Mérieux ou Institut Pasteur de Paris). Parmi les produits commerciaux, ce sont les antiglobulines fluorescentes de l'Institut Pasteur de Paris, qui nous ont donné les meilleurs résultats. Ces conjugués ont, en effet, un titre assez élevé pour qu'ils puissent être employés à la dilution 1/20 dans du tampon à pH 7,2 au lieu de 1/8 pour le produit BD Mérieux.

D - Contre-coloration

Comme la plupart des parasites, les amibes sont susceptibles de présenter des fluorescences non spécifiques liées, soit à leur auto-fluorescence, soit à la fixation d'anticorps " naturels ". Ceci peut gêner considérablement la lecture, puisqu'il est difficile d'apprécier ce qui revient à la fluorescence spécifique.

C'est pourquoi, il est extrêmement avantageux de procéder à une contre-coloration.

Sur les conseils de GOLDMAN, nous avons, dès 1965, utilisé comme produit de contraste le Bleu d'EVANS (1) à la concentration 1/200 en solution dans du tampon à pH 7,2. Cette contre-coloration n'augmente que de très peu la durée de la réaction. Elle fournit des images très nettes : coloration rouge des amibes si la réaction est négative, coloration jaune-verte si le sérum examiné est positif. Comme l'avait signalé GOLDMAN, en fonction de l'intensité des résultats, on observe soit une fluorescence jaune-verte des parasites, soit une fluorescence périphérique, la partie centrale des amibes étant colorée en rouge. Très récemment, nous avons repris pour l'amibiase, la technique d'action du conjugué et de contre-coloration en un temps

(1) Bleu d'EVANS RAL.

qui a été mise au point pour la toxoplasmose (Madame A. CORNET). Pour cela, après avoir fait réagir les sérums étudiés, on lave les lames, et les étalements sont recouverts d'un mélange de :

- une goutte (1/20 de ml), de conjugué fluorescent anti-gamma-globulines humaines
- un millilitre de Bleu d'EVANS à 1/200 dans du tampon à pH 7,2.

On laisse agir pendant 30 minutes à 37°, puis les lames sont lavées à deux reprises dans du tampon. On recouvre les étalements d'une lamelle montée sur glycérine tamponnée, puis on examine.

Cette technique, dont nous n'avons encore qu'une expérience limitée, paraît donner des résultats aussi bons que la méthode classique que nous avons employée ; en particulier, nous n'avons noté aucune variation des taux de sérums examinés. Si ces premiers résultats se trouvent confirmés, cette contre-coloration pratiquée en même temps que l'action du conjugué, constituerait une amélioration pratique indéniable puisqu'elle diminue la durée de la réaction de 20 minutes environ.

o

o o

- 7 - Laver à deux reprises (cf 3 et 5) ; sécher les lames devant un ventilateur puis les recouvrir d'une lamelle montée sur glycérine tamponnée à pH 7,2 (1).

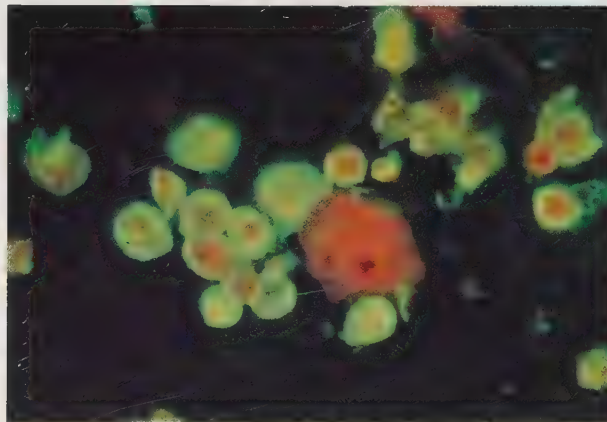
. Lecture des résultats : elle est effectuée avec un microscope REICHERT-ZETOPAN muni d'un condensateur à fond clair. Nous utilisons un grossissement très faible (objectif x 10, oculaire x 8,5) ce qui permet d'examiner en même temps un très grand nombre d'amibes. Grâce à des ocellères en caoutchouc adaptées sur les oculaires, la lecture peut s'effectuer dans une pièce presque normalement éclairée.

. Filtres utilisés :

- Filtre d'émission BG 12/6 mm
- Filtres d'arrêt CG 9/1 mm, et CG 1/1,5 mm.

La lecture des résultats est faite immédiatement après la réaction ou éventuellement après un certain délai. Les préparations peuvent être conservées une semaine à 10 jours à l'abri de la lumière, sans que l'on note une baisse importante de la fluorescence.

(1) Glycérine tamponnée : 9 volumes de glycérine + un volume de tampon à pH 7,2.



DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE L'AMIBIASE
PAR L'IMMUNO-FLUORESCENCE.

Fluorescence spécifique jaune-verte des trophozoïtes de
entamoeba histolytica. Les diverses impuretés sont colorées
en rouge par le bleu d'EVANS

III - INTERET DE NOTRE TECHNIQUE D'IMMUNO-FLUORESCENCE

1° - AVANTAGES MATERIELS

Cette réaction d'immuno-fluorescence nous paraît présenter d'importants avantages sur le plan pratique en ce qui concerne les conditions d'obtention de l'antigène. Nous avons vu, en effet, toutes les difficultés rencontrées pour préparer et purifier de l'antigène soluble à partir de cultures amibiennes. Au contraire, la préparation de l'antigène figuré est simple et permet surtout une importante économie du matériel parasitaire. Au cours de notre étude, nous avons pratiqué quelques réactions de précipitation en gélose. Pour cette réaction, la quantité d'antigène nécessaire à l'étude de quatre sérums non dilués exigeait un tube de culture amibienne. Avec cette même quantité de parasites, nous aurions pu effectuer de 50 à 60 réactions d'immuno-fluorescence (10 à 12 sérums à 5 dilutions).

Grâce à cette économie, l'immuno-fluorescence a plus de chance que les autres techniques, de passer dans la pratique courante.

2° - SPECIFICITE

La lecture des résultats s'effectuant sur l'aspect des parasites, l'immuno-fluorescence présente dès le départ peu de risques de réaction faussement positive due à la flore microbienne associée aux cultures d'amibes (ceci s'oppose à ce qui est observé avec les réactions employant un antigène

soluble).

Par ailleurs, nous avons vérifié la spécificité de cette technique en étudiant :

- des sérums normaux ou prélevés au cours d'affections autres que l'amibiase, face à l'antigène *Entamoeba histolytica*
- puis des sérums d'amibiens que nous avons fait réagir face à différents types d'antigènes
- enfin, des sérums expérimentaux.

a) Etude de 140 sérums prélevés chez des sujets sains ou présentant diverses affections :

Nous avons étudié :

- 5 sérums de porteurs de kystes d'*Entamoeba coli*
- 8 sérums de porteurs de *Lamblia*
- 2 sérums de porteurs de *Trichomonas intestinalis*
- 10 sérums de malades atteints de Bilharziose intestinale
- 10 sérums de malades atteints de Toxoplasmose
- 10 sérums de Distomiens
- 10 sérums de sujets atteints d'hydatidose
- 20 sérums de syphilitiques
- et 5 sérums de sujets présentant une hépatite virale.

Chaque fois que cela a été possible, ces sujets ont été choisis à dessein parmi ceux qui donnaient les résultats les plus fortement positifs dans les réactions sérologiques homologues.

Comme autres contrôles, nous avons analysé 60 sérums prélevés à LYON chez des nouveaux-nés sains (sang du cordon) ; ces prélèvements nous servant de témoins négatifs.

Tous ces sérums ont été étudiés au 1/12, 1/25, 1/50 et 1/100.

La quasi totalité d'entre eux s'est révélée positive au 1/12, le tiers seulement était faiblement positif au 1/25, et ceci aussi bien pour les sujets témoins que pour les autres ; enfin, dans tous les cas, les résultats ont été négatifs au 1/50.

Il semble donc que les réactions croisées constatées aux dilutions inférieures à 1/50, correspondent à des anticorps naturels, puisqu'elles sont retrouvées avec la même proportion chez les sujets témoins.

Bien qu'elles soient généralement très faibles, ces réactions croisées nous ont amené par prudence à utiliser comme première dilution le 1/50; ce seuil assure à la réaction une spécificité qui semble absolue dans l'état actuel de notre expérience.

b) Etude antigénique comparée de différentes souches ou espèces d'amibes :

Nous avons fait réagir 15 sérums normaux et 15 sérums d'amibiens (positifs à titres variables) sur des étalements préparés à partir de nos trois souches d'*Entamoeba histolytica*.

Aucune variation quantitative ou qualitative n'a été enregistrée d'une souche à l'autre. Pourtant ces souches étaient en culture depuis des temps plus ou moins longs : 13 ans pour la souche AS, 3 ans pour la souche W, et 2 ans pour la souche NS. Il ne semble donc pas que la durée de la période pendant laquelle les souches d'amibes histolytiques sont cultivées modifie l'activité antigénique. Cependant, nos conditions de travail

n'étaient pas suffisamment précisés pour que nous puissions conclure formellement, puisque nos seuls critères d'appréciation reposent sur une étude quantitative comparée des différents sérums face à chaque type d'antigène.

Comme nos trois souches d'amibes donnent des résultats identiques, c'est avec la souche AS que nous avons effectué l'ensemble des sérologies et ceci pour des raisons de commodité d'emploi (l'antigène AS étant le plus facile à purifier).

Trente sérums, dont quinze d'amibiens ont été étudiés en parallèle avec des antigènes préparés à partir :

- d'*Entamoeba histolytica* souche AS
- d'*Entamoeba coli*
- d'*Entamoeba invadens* (1).

Ces deux dernières espèces sont entretenues sur gélose asparagine. Les étalements ont été effectués dans les mêmes conditions que pour *Entamoeba histolytica*, avec cependant, de très grosses difficultés pour la purification des suspensions obtenues.

Quel que soit le type d'antigène, tous les sujets témoins ont été trouvés négatifs à la dilution contrôle de 1/50. Les sérums d'amibiens, qui étaient les plus positifs (de 1/100 à 1/1600), face à l'antigène anti *Entamoeba histolytica*, ont tous été trouvés négatifs au 1/50 avec *Entamoeba invadens*. Dans un seul cas, nous avons noté une réaction positive au 1/50 avec l'antigène *Entamoeba coli*, tous les autres sérums étant négatifs à cette dilution, avec cet antigène.

Dans l'ensemble, ces résultats confirment ceux de GOLDMAN. Il faut cependant préciser que nous avons travaillé avec des sérums prélevés

(1) Nous devons cette souche à l'amabilité de M. CARRE du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Toulouse (Professeur BOUISSET).

au cours d'affections spontanées, et non pas, comme GOLDMAN, avec des sérums expérimentaux hyper-immuns.

c) Contrôle de spécificité à partir de sérums expérimentaux :

Nous avons complété ce travail en étudiant des sérums de rats inoculés par voie sous-cutanée, avec respectivement :

- Entamoeba histolytica, souches AS, NS, et W
- Entamoeba coli
- Entamoeba invadens.

Ces animaux ont reçu pendant deux mois une injection sous-cutanée, tous les 10 jours. On injectait chaque fois le contenu d'un tube de culture grossièrement débarassée par lavage dans du sérum physiologique stérile, d'une partie de ses germes. Dans tous les cas, nous avons noté l'apparition au point d'inoculation, d'abcès dans lesquels les amibes n'ont pu être retrouvées.

Ces animaux ont été ponctionnés 15 jours après la dernière injection.

Les réactions d'immuno-fluorescence ont été effectuées suivant la technique habituelle, avec un conjugué anti-gamma-globulines de rat, de l'Institut Pasteur de Paris, dilué au 1/10 dans du tampon.

Les réactions témoins pratiquées avec des sérums de rats sains du même âge nous ont permis de situer le seuil de spécificité au 1/2.

Les résultats obtenus avec ces sérums expérimentaux sont réunis dans le tableau suivant :

R A T S		A N T I G E N E S				
	N° des rats	AS	NS	W	E. coli	E. invadens
<u>Lot n° 1</u> anti E.histolytica souche AS	1	1/8	1/8	1/8	neg.	neg.
	2	1/16	1/16	1/16	neg.	neg.
	3	1/8	1/8	1/8	neg.	neg.
<u>Lot n° 2</u> anti E.histolytica souche NS	1	1/4	1/4	1/4	neg.	neg.
	2	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	3	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
<u>Lot n° 3</u> anti E.histolytica souche W	1	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
	2	1/4	1/4	1/4	neg.	neg.
	3	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
<u>Lot n° 4</u> anti E. coli	1	neg.	neg.	neg.	1/4	neg.
	2	neg.	neg.	neg.	1/4	neg.
	3	neg.	neg.	neg.	1/4	neg.
<u>Lot n° 5</u> anti E. invadens	1	neg.	neg.	neg.	neg.	1/4
	2	neg.	neg.	1/4	neg.	1/8
	3	neg.	neg.	neg.	neg.	1/4

On voit donc qu'il n'existe pas de réaction croisée décelable entre les souches d'*Entamoeba histolytica* et *Entamoeba coli* ou *Entamoeba invadens*. Par contre, comme précédemment, nous trouvons une activité antigénique sensiblement identique pour les trois souches d'*Entamoeba histolytica*.

Seuls les sérums correspondant à la souche AS d'*Entamoeba histolytica*, nous ont donné des taux significatifs ($1/8$, $1/16$), mais qui sont cependant assez bas. Ceci est certainement dû à une mauvaise immunisation des animaux et à l'abondance de la flore microbienne associée qui induit une forte production d'anticorps anti-microbiens, alors que les anticorps anti-*Entamoeba histolytica* restent peu élevés. En effet, nous avons pu pratiquer des réactions de précipitation simple en gélose (OUCHTERLONY) en faisant réagir nos sérums face à des antigènes anti-*Entamoeba histolytica* (AS) et à un antigène extrait de la flore associée. Nous n'avons jamais observé de lignes de précipité face à l'antigène amibien (ce qui n'est pas surprenant, étant donné la faible sensibilité de la réaction d'OUCHTERLONY) alors que tous les sérums révélaient un ou deux arcs face à l'antigène microbien.

Tous les sérums anti-*Entamoeba histolytica* (souches NS et W) et anti-*Entamoeba coli*, n'ont donné que des taux très bas, face à l'antigène spécifique, ou même des réactions négatives à la dilution contrôle de $1/2$; ceci correspond vraisemblablement à la pauvreté des cultures de chacune de ces souches comparativement à la densité parasitaire de la souche AS.

Enfin, les animaux inoculés avec *Entamoeba invadens* ont donné des taux intermédiaires ($1/4$, $1/8$) en rapport avec la richesse des cultures.

Dans l'ensemble, ces contrôles de spécificité nous ont donc permis de retrouver en partie les résultats de GOLDMAN concernant

les propriétés antigéniques comparées de différentes espèces d'amibes.

Ce travail a surtout permis de préciser qu'en pratique, on devait retenir, pour la sérologie des amibiases humaines par immuno-fluorescence sur *Entamoeba histolytica* (souche AS) le taux de 1/50 comme première dilution significative.

3° - SENSIBILITE

La sensibilité de cette réaction paraît très élevée puisque certains sérums ont encore été positifs à la dilution de 1/3200. Ceci est évidemment compensé en partie par le seuil assez élevé de significativité. Cependant, sur le plan pratique, c'est grâce à sa grande sensibilité que l'immuno-fluorescence doit de n'exiger que des quantités minimales de sérums et d'antigène.

4° - REPRODUCTIBILITE

La reproductibilité a été systématiquement recherchée en testant des sérums avec différents lots d'antigènes, fraîchement préparés ou en répétant les examens avec des sérums ou des antigènes conservés depuis un temps plus ou moins long (dans les limites que nous avons indiquées précédemment pour chaque type de conservation). Dans tous les cas, nous n'avons pas noté de différence excédant un degré de dilution, ce qui correspond à la marge d'erreur généralement admise pour toutes les réactions sérologiques quantitatives connues jusqu'ici.

o

o o

IV - RESULTATS OBTENUS DANS L'ETUDE DE SERUMS PRELEVES
AU COURS D'AMIBIASES EXPERIMENTALES
OU
D'AMIBIASES HUMAINES SPONTANEEES

Nous avons appliqué notre technique d'immuno-fluorescence à l'étude de plusieurs centaines de sérums prélevés chez des amibiens ou d'anciens amibiens.

Avant d'envisager les résultats obtenus dans ce travail, nous considérerons les données observées au cours de quelques recherches sur des animaux infectés expérimentalement, ces recherches ayant pour but de déterminer la précocité d'apparition des anticorps anti-Entamoeba histolytica.

1° - AMIBIASES EXPERIMENTALES

Notre étude a été réalisée à partir de rats ou de hamsters.

a) Immuno-fluorescence pratiquée chez le rat

. Rats inoculés par voie intra-caecale

Nous avons utilisé des rats blancs âgés de quatre semaines, qui ont été inoculés par voie intra-caecale avec une souche virulente d'Entamoeba histolytica (1). Cette souche est entretenue sur l'animal : passages tous les 4 jours, l'inoculation étant réalisée, après ouverture du péritoine, à partir du contenu caecal des rats inoculés quatre jours auparavant.

(1) Nous devons cette souche au Laboratoire de Parasitologie du C.H.U. Saint-Antoine de Paris (Prof. GOLVAN , Dr HOUIN et Dr GARGOURI).

Dans tous les cas, des amibes mobiles, hématophages, sont mises en évidence dans le mucus caecal. Malheureusement, la maladie est rapidement mortelle (3ème au 7ème jour) et nous n'avons obtenu aucune survie supérieure à une semaine.

Toutes les réactions d'immuno-fluorescence ont été négatives.

b) Réactions d'immuno-fluorescence pratiquées chez des hamsters inoculés par voie intra-hépatique

Ces animaux ont été infestés dans le Service du Docteur LAMBERT (Société CIBA à Bâle), par Madame R. JARUMILINTA, selon la technique suivante :

Un morceau de gélatine (spongostan) est imbibé avec environ 35 000 amibes de cultures (souche virulente). Ce fragment est placé entre deux lobes hépatiques des hamsters, qui, en l'absence de traitement, développent un abcès amibien du foie dont l'évolution est mortelle en quatre jours.

Sur 15 sérums étudiés, nous avons :

- 5 sérums témoins (un sérum d'animal non infesté, quatre sérums d'animaux traités mais non infestés).
- 2 sérums prélevés au 4ème jour après infestation sans traitement.
- 4 sérums prélevés au 6ème jour chez des animaux infestés et traités (32 644 CIBA ou AMBILHAR 100 mg/Kg/jour).
- 3 sérums provenant également d'animaux infestés et traités, mais prélevés plus tardivement, au 14ème, 22ème ou 31ème jour.

Tous ces sérums ont été prélevés à Bâle et nous ont été

adressés par avion dans un container à glace carbonique. Nous les avons conservés jusqu'au moment de la réaction au congélateur à azote liquide.

Les réactions d'immuno-fluorescence (technique indirecte avec contre-coloration) ont été réalisées avec du conjugué anti-gamma-globulines de hamster de l'Institut Pasteur de Paris, dilué au 1/10 dans du tampon. Par rapport à des sérums normaux, la première dilution significative est de 1/12. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant.

SEROLOGIE EFFECTUEE CHEZ DES HAMSTERS INOCULES PAR VOIE HEPATIQUE

NATURE DES SERUMS	RESULTATS
1 sérum témoin négatif	Négatif
5 sérums témoins (traitement sans infestation)	Négatif
2 sérums prélevés au 4ème jour (infestés, non traités)	Négatif
4 sérums prélevés au 6ème jour (infestés, traités)	Négatif
1 sérum prélevé au 14ème jour (infesté, traité)	Positif au 1/50
1 sérum prélevé au 22ème jour (infesté, traité)	Positif au 1/100
1 sérum prélevé au 33ème jour (infesté, traité)	Positif au 1/100

Ces résultats recourent assez exactement ceux qui ont été obtenus chez les rats infestés par voie caecale. En effet, en l'absence de traitement, l'évolution de l'amibiase expérimentale est trop rapide pour que les animaux puissent élaborer des anticorps anti-*Entamoeba histolytica*. Si l'amibiase est traitée, il semble que ces anticorps apparaissent entre le sixième et le quatorzième jour, tout au moins, en ce qui concerne les hamsters inoculés par voie intra-hépatique.

2° - AMIBIASES HUMAINES

Nous avons, au total, analysé 390 sérums humains prélevés chez des malades ayant une amibiase certaine, des antécédents amibiens, ou ayant vécu en zone d'endémie amibienne.

Comme nous l'avons déjà indiqué, la grande majorité de ces sérums ont été prélevés à Lyon (1). Les autres nous ont été adressés par des correspondants d'Afrique du Nord, d'Afrique Noire et du Cambodge.

Sur 390 examens, nous n'en retiendrons que 175 pour lesquels nous avons pu disposer de renseignements cliniques et biologiques suffisants.

Dans la plupart des cas, en effet, les examens de contrôle parasitologiques n'ont pas été effectués par nous. Les conditions dans lesquelles ont été effectués ces examens coprologiques et surtout le nombre de ces examens ont donc été extrêmement variables. Ceci a été pour nous un très grand handicap dans l'interprétation de nos résultats.

Nous envisagerons ces résultats en fonction du type d'amibiase, mais en tenant compte aussi des diverses catégories ethniques, puisque les études réalisées jusqu'ici par la sérologie ont toutes confirmé l'importance de ce facteur.

(1) En particulier à l'Hôpital d'Instruction des Armées Desgenettes, dans le Service du Médecin-colonel FELIX, que nous tenons à remercier de l'aide qu'il nous a apportée.

Sur le plan des types cliniques, nous envisagerons successivement:

- les abcès amibiens du foie et les hépatites amibiennes
- les dysentéries amibiennes aiguës récentes
- les rechutes aiguës d'amibiases anciennes
- les amibiases intestinales chroniques
- les colites méta-amibiennes chez des porteurs de formes minuta ou de kystes
- les colites méta-amibiennes avec coprologie négative
- les anciennes amibiases guéries sans séquelles
- les porteurs sains (kystes ou formes minuta) sans antécédents aigus
- les sujets ayant vécu ou étant originaires de pays d'endémie, et sans signes cliniques ni parasitologiques d'amibiase, (mais présentant le plus souvent d'autres parasitoses).

Dans trois cas (deux localisations hépatiques et un amoebome caecal), nous avons pu pratiquer des réactions après traitement, ce qui permet une première idée de la valeur de l'immuno-fluorescence, comme moyen de contrôle post-thérapeutique.

Par ailleurs, pour 66 sérums, nous avons pu effectuer parallèlement une réaction d'OUCHTERLONY et une réaction d'immuno-fluorescence comparant ainsi les données fournies par ces deux méthodes.

a) Hépatites amibiennes et abcès amibiens du foie :

Vingt et une sérologies ont été pratiquées avant traitement.

HEPATITES AMIBIENNES

Origine Ethnique	Européens	Africains
Nombre de cas	1 cas	2 cas
Numéro de l'observation Lieu de contamination et titre des anticorps fluorescents	n° 245 CAMEROUN (y réside habituellement) + 1/3200	n° 290 - CAMEROUN + 1/800
		n° 291 - CAMEROUN + 1/1600

ABCES AMIBIENS DU FOIE

Origine Ethnique	Européens	Africains	Extrême-Orientaux
Nombre de cas	4 cas	13 cas	1 cas
N° de l'observation.	n° 115 - MAROC + 1/800	n° 107-SENEGAL + 1/400	n° 102 - CAMBODGE + 1/1600
Lieu de contamination.	n° 142, non précisé Stewart ayant séjourné en plusieurs pays d'endémie + 1/600	n° 177-SENEGAL + 1/1400	
Titre des anticorps fluorescents	n° 193, Indochine Algérie + 1/200	n° 233-CAMEROUN + 1/800	
		n° 234-CAMEROUN + 1/3200	
		n° 235-CAMEROUN + 1/800	
		n° 236-CAMEROUN + 1/600	
		n° 237-CAMEROUN + 1/800	
		n° 238-CAMEROUN + 1/400	
		n° 241-CAMEROUN + 1/800	
		n° 242-CAMEROUN + 1/3200	
		n° 244-CAMEROUN + 1/1600	
		n° 246-CAMEROUN + 1/800	
		n° 307-ANTILLES + 1/800	
	n° 389, non précisé + 1/800		

Pour l'ensemble de ces malades, la répartition des titres et des taux moyens, est la suivante pour chaque groupe ethnique.

Origine ethnique	Européens (5 cas)	Africains (15 cas)	Extrême-Orientaux (1 cas)
Titre : 1/200	1	0	0
Titre : 1/400	0	3	0
Titre : 1/800	2	7	0
Titre : 1/1600	1	3	1
Titre : 1/3200	1	2	0
Taux moyen	1/1320	1/1200	1/1600

En ce qui concerne ces 21 malades, on constate que la réaction d'immuno-fluorescence est positive dans tous les cas et généralement à des titres très élevés. Elle semble donc présenter une grande valeur diagnostique dans le cas des amibiases hépatiques où précisément, les autres moyens de diagnostic biologique sont très souvent en défaut.

Par ailleurs, et bien que le nombre de malades ne soit pas le même dans chaque catégorie, on constate que les taux obtenus sont en moyenne comparables, quelle que soit l'origine ethnique.

b) Amibiases intestinales aiguës de primo-infestations

Origine ethnique	Européens	Nord Africains	Africains
Nombre de cas	2	1	7
N° de l'observation.	n° 13-Madagascar,	n° 151-Algérie	n°103, Sénégal
Lieu de contamination.	Brésil	(Constantinois)	+ 1/50
Titre des anticorps fluorescents.	Cameroun	négatif	n°106, Sénégal
	Indes		+ 1/100
	+ 1/100		n°109, Sénégal
	n° 91		+ 1/50
	Extrême-Orient		n°110, Sénégal
	Négatif		+ 1/50
			n°111, Sénégal
			+ 1/50
			n° 112, Sénégal
			+ 1/200
			n° 372, Sénégal
			+ 1/400

Sur ces 10 cas, on obtient :

- 2 résultats négatifs
- 4 sérologies positives à 1/50, c'est-à-dire à la dilution initiale
- 2 sérologies positives à 1/100
- 1 sérologie positive à 1/200
- 1 sérologie positive à 1/400.

Table 1. Summary of the data collected for the study			
Variable	Unit	Mean	Standard deviation
Age	Years	34.5	10.2
Gender	Male/Female	15/15	
Education	High school/College/University	10/10/10	
Occupation	Student/Teacher/Engineer/Doctor/Lawyer/Artist/Writer/Actor/Politician/Entrepreneur	10/10/10/10/10/10/10/10/10/10	
Income	Monthly income (USD)	1500	500
Marital status	Single/Married/Divorced/Widowed	10/10/10/10	
Religion	Christianity/Islam/Judaism/Hinduism/Buddhism/Sikhism/Jainism/Spiritualism/Other	10/10/10/10/10/10/10/10	
Health status	Good/Fair/Poor	10/10/10	
Exercise frequency	Times per week	3	2
Dietary habits	Vegetarian/Non-vegetarian	10/10	
Stress level	Low/Medium/High	10/10/10	
Sleep quality	Good/Fair/Poor	10/10/10	
Work-life balance	Good/Fair/Poor	10/10/10	
Life satisfaction	Low/Medium/High	10/10/10	
Overall health	Good/Fair/Poor	10/10/10	

La réaction ne donne donc que des résultats inconstants et sa valeur diagnostique est beaucoup moins grande pour les formes purement intestinales, puisque deux sérologies sur dix ont été négatives.

c) Rechutes aiguës d'amibiases anciennes

8 sujets, tous européens.

Numéro de l'observation	Lieu de contamination	Titre des anticorps fluorescents
n° 1	Indochine	Négatif
n° 4	Amibiase autochtone	+ 1/50
n° 7	Sahara	+ 1/100
n° 8	Maroc	+ 1/50
n° 14	Indochine	+ 1/100
n° 20	Algérie	+ 1/100
n° 58	Tunisie	+ 1/100
n° 62	Algérie	+ 1/50

Soit en résumé :

- un résultat négatif
- trois positifs à 1/50
- quatre positifs à 1/100

Ce qui correspond sensiblement aux résultats obtenus avec les amibiases intestinales aiguës récentes. Il ne semble donc pas que pour les dysentéries amibiennes, l'ancienneté de l'infestation modifie nettement les résultats de l'immuno-fluorescence.

d) Amibiases intestinales chroniques (3 cas)

Origine ethnique	Africains	Nord-Africains
Nombre de cas	2	1
N° de l'observation	n° 108, Sénégal	n° 152, Algérie
Lieu de contamination	+ 1/50	+ 1/100
Titre des anticorps fluorescents	n° 239, Cameroun + 1/100	

e) Colites méta-amibiennes avec présence de kystes ou de formes minuta

Six cas, tous Européens ayant séjourné en Indochine.

Numéro de l'observation	Titre des anticorps fluorescents
n° 2	+ 1/50
n° 21	Neg.
n° 53	+ 1/50
n° 60	Neg.
n° 63	Neg.
n° 84	Neg.

. colites méta-amibiennes avec examen coprologique négatif, 16 cas.

- 1 Indien (n° 60) : négatif
- 15 Européens (militaires contaminés au cours de divers séjours en Outre-Mer : Indochine, Afrique Noire, Algérie).
(12 négatifs, 3 positifs à 1/50).

f) Amibiases anciennes, guéries après traitement, sans séquelles parasitologiques ni cliniques

- 7 cas, tous Européens (militaires ayant effectué plusieurs séjours en zone d'endémie).
(6 cas négatifs, un positif à 1/50).

g) Porteurs sains (kystes ou formes minuta) sans antécédents aigus

- 9 cas, 8 Européens : tous négatifs
1 Africain : négatif.

h) Examens systématiques pratiqués chez des sujets originaires de pays d'endémie ou ayant séjourné dans ces zones, sans signes cliniques ou biologiques d'amibiases

- 95 cas : Européens ayant séjourné en pays d'endémie :
47 cas (43 négatifs, 2 positifs à 1/50, 2 positifs à 1/100).

Ces deux dernières observations concernent des sujets ayant vécu plusieurs années, l'un en Côte d'Ivoire, l'autre au Cameroun, et qui étaient tous deux polyparasités. Il ne semble pas y avoir eu d'antécédents amibiens, bien que les examens coprologiques n'aient pas été pratiqués lors du séjour en pays d'endémie. Etant donné les risques de contagio, le doute peut tout de même persister.

Africains originaires de zones d'endémie amibienne, récemment arrivés en France et pratiquement tous polyparasités : 48 cas.

Les résultats sont les suivants :

- 32 cas négatifs

- 9 positifs au 1/50
- 7 positifs au 1/100.

C'est donc pour ces sujets " contacts " que des différences nettes peuvent être retrouvées en fonction de l'origine ethnique. En effet, pour deux lots presque identiques de sujets, on a chez les Européens 8% de résultats positifs, alors que l'on en trouve 18% chez les Africains. Ceci correspond assez exactement à ce qui a été observé par d'autres auteurs, et notamment par les Sud-Africains (POWELL, MADDISON, ELSDON DEW), avec d'autres techniques sérologiques.

En fait, les résultats différents observés chez des Africains noirs et chez des Européens, peuvent s'expliquer de plusieurs façons :

- les facteurs ethniques, et surtout, les conditions de vie
- le fait que les Européens n'ont, dans certains cas, séjourné que quelques années, voire quelques mois, en zone d'endémie
- enfin la difficulté que l'on rencontre à faire préciser chez les Africains, des antécédents amibiens, et donc de pouvoir éliminer ces antécédents.

Il est possible que chez les 48 Africains examinés, certains d'entre eux aient présenté à un moment donné, une amibiase qui n'a pu être précisée par le malade. En effet, même l'émission de selles sanglantes à un moment ou à un autre, a été souvent rattachée à une bilharziose intestinale, et les examens coprologiques qui auraient permis de préciser le diagnostic n'ont pratiquement jamais été réalisés.

3° - VALEUR DIAGNOSTIQUE DE L'IMMUNO-FLUORESCENCE

Pour mieux dégager la valeur diagnostique de notre réaction d'immuno-fluorescence, nous avons groupé dans le tableau suivant, l'ensemble des résultats obtenus.

Diagnostic	Nombre de cas	Neg.	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
Hépatites amibiennes	3	0	0	0	0	0	1	1	1
Abcès amibiens du foie	18	0	0	0	1	3	8	4	2
Amibiases aiguës (primo-infestation)	10	2	4	1	2	1	0	0	0
Rechutes aiguës d'amibiases anciennes	8	1	3	4	0	0	0	0	0
Amibiases intestinales chroniques	3	0	1	2	0	0	0	0	0
Colites méta-amibiennes : • avec kystes ou formes minuta • coprologie négative	6 16	4 13	2 3	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Amibiases anciennes sans séquelles	7	6	1	0	0	0	0	0	0
Porteurs sains	9	9	0	0	0	0	0	0	0
Examens systématiques après contage possible									
• Européens	47	43	2	2	0	0	0	0	0
• Africains	48	32	9	7	0	0	0	0	0

Comme nous l'avons déjà vu, c'est uniquement pour les localisations hépatiques, que l'immuno-fluorescence présente une valeur diagnostique indiscutable, puisqu'elle est positive dans 100% des cas, à des taux en général très élevés, et ceci, quelle que soit l'origine ethnique.

Cela est d'autant plus intéressant que c'est précisément pour les amibiases extra-intestinales, hépatiques en particulier, que la sérologie prend toute sa valeur. Le diagnostic d'abcès amibien du foie rencontre en effet de multiples difficultés puisque le parasite n'est que rarement retrouvé dans le pus ponctionné.

On est donc amené à faire ce diagnostic en groupant un faisceau de présomptions :

- séjour en zone d'endémie amibienne
- antécédents amibiens
- signes cliniques traduisant un abcès hépatique
- enfin après ponction, aspect " chocolat " du pus qui est classiquement aseptique.

L'apport d'une réaction sérologique devient ici spécialement important alors qu'il est relativement secondaire pour les formes intestinales où l'on dispose d'autres moyens de diagnostic (examens coprologiques).

Pour ces formes intestinales, l'immuno-fluorescence donne d'ailleurs des résultats beaucoup plus inconstants puisque la réaction est négative dans deux cas sur dix de formes aiguës d'emblée, et dans un cas sur huit de rechutes aiguës d'amibiases anciennes. Les taux observés sont, dans l'ensemble, peu élevés.

Pour toutes les autres catégories de malades, amibiases anciennes guéries, porteurs sains, colites méta-amibiennes, etc... la réaction est dans l'ensemble négative, sauf chez les Africains où un certain pourcentage

de positivité peut être observé. Nous retiendrons en particulier, le fait que dans les colites méta-amibiennes, les résultats sont négatifs dans 17 cas sur 22, ce qui, dans une certaine mesure, peut éventuellement permettre de différencier les affections séquellaires des amibiases encore évolutives.

Mais l'immuno-fluorescence ne peut, en la matière, apporter qu'une présomption, puisqu'elle ne fournit pas de résultats absolus pour les formes purement intestinales.

Par ailleurs, le simple portage de formes non pathogènes n'entraîne aucune réponse immunologique comme cela est logique à propos de parasites vivant dans la lumière intestinale, à la surface de la muqueuse, et ne pénétrant pas dans les tissus.

4° - COMPARAISON DE L'IMMUNO-FLUORESCENCE ET DE LA PRECIPITATION SIMPLE EN GELOSE

Pour 66 sérums, nous avons effectué en parallèle une réaction d'immuno-fluorescence et une réaction selon la technique d'OUCHTERLONY.

Pour cette dernière, nous avons utilisé un antigène soluble préparé à partir de la souche AS d'Entamoeba histolytica, purifiée selon les mêmes procédés que pour la préparation de l'antigène pour l'immuno-fluorescence.

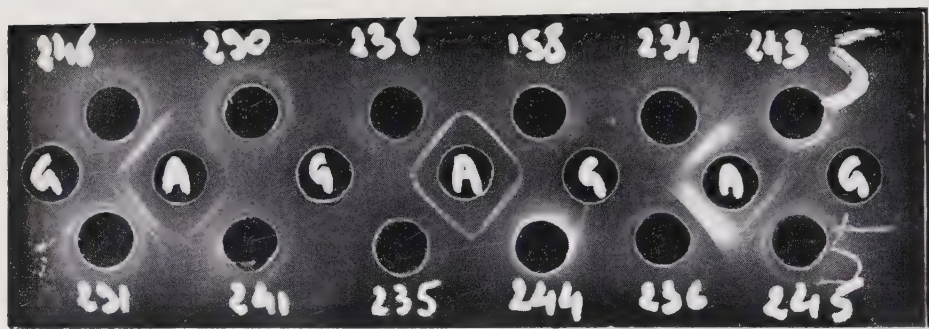
Après cette purification, la densité parasitaire de la suspension amibienne est ramenée à 2 ou 3 millions de trophozoïtes par millilitre. Puis, par une série de congélation, décongélation, les parasites sont lysés. On centrifuge alors à 5000 tours/minute pendant 20 minutes, et seul le surnageant est retenu. Comme nous l'avons déjà indiqué, chaque réaction d'OUCHTERLONY a nécessité pour l'étude de quatre sérums non dilués une quantité d'amibes équivalant en moyenne à un tube de culture riche au 6ème jour.

Par ailleurs, pour apprécier la spécificité de la réaction, nous avons simultanément utilisé un antigène préparé à partir de la flore microbienne associée débarrassée des amibes par centrifugation à faible vitesse, puis lavé à plusieurs reprises de manière à éliminer toute trace d'antigène amibien soluble. C'est face à ces deux types d'antigènes, que l'on fait réagir chacun des 66 sérums considérés (Photo OUCHTERLONY).

Pour avoir une idée des réactions sur le plan quantitatif, nous avons apprécié les réactions d'OUCHTERLONY par un nombre variable de croix, correspondant généralement au nombre de traits observés ou, dans le cas d'un trait unique, à l'épaisseur de l'arc de précipité.

Les 66 sérums analysés ont tous été prélevés chez des malades présentant une amibiase aiguë, intestinale ou hépatique, une amibiase chronique ou de simples antécédents amibiens. Soixante quatre sérums étaient positifs en immuno-fluorescence, les deux sérums négatifs ont été choisis parmi les cas d'amibiases intestinales aiguës chez lesquelles on n'avait pas retrouvé d'anticorps fluorescents.

Immuno-fluorescence	Neg.	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	Total
Réaction d'OUCHTERLONY négative	2	24	10	1	0	0	0	0	37
Réaction positive ~	0	1	4	2	2	3	3	0	15
++	0	0	0	0	0	4	1	1	6
+++	0	0	0	0	1	3	1	1	6
++++	0	0	0	0	0	0	1	1	2
TOTAL	2	25	14	3	3	10	6	3	<u>66</u>



RÉACTION DE DIFFUSION SIMPLE EN GÉLOSE PAR LA MÉTHODE D'OUCHTERLONY APPLIQUÉE A L'AMIBIASÉ

A = Antigène amibien

G = Antigène extrait de la flore microbienne associée

Dans l'ensemble, la réaction d'OUCHTERLONY est beaucoup plus souvent négative que l'immuno-fluorescence (37 cas sur 66 au lieu de 2) pour les amibiases certaines. En particulier, les deux sérums d'amibiases aiguës trouvés négatifs en immuno-fluorescence l'ont été également en précipitation simple en gélose.

Ce n'est que pour des sérums ayant en immuno-fluorescence un taux égal ou supérieur à 1/400 que la réaction d'OUCHTERLONY est constamment positive.

Cette technique présente donc comme inconvénients :

- son manque de spécificité
- sa faible sensibilité
- et surtout, les difficultés d'obtention de l'antigène.

En ce qui concerne la spécificité, nos conditions de travail ne nous ont pas permis d'étudier en précipitation en gélose, des sérums d'individus présentant diverses parasitoses. On sait cependant, par les travaux publiés jusqu'ici, que l'on observe assez fréquemment des réactions croisées ou des résultats faussement positifs.

Sauf pour de rares auteurs, qui travaillant dans des conditions privilégiées ont pu préparer un antigène amibien ne comportant aucune fraction provenant de la flore microbienne (SCHNEIDER et THOMPSON aux Etats-Unis), les extraits antigéniques qui sont utilisés en pratique sont toujours susceptibles de contenir des traces d'antigène microbien. Dans ces conditions, si l'on observe des lignes de précipité, il se pose toujours le problème de savoir s'il s'agit de réactions spécifiques ou non. On peut préciser les résultats obtenus en étudiant les sérums simultanément, face à un antigène amibien et à un antigène extrait de la flore microbienne associée. C'est cette technique que nous avons suivie, elle nous a permis d'obtenir dans un tiers de cas environ, des arcs de précipité avec l'antigène microbien, sans que la présence de ces arcs et leur nombre soient en relation avec les

résultats obtenus pour le même sérum face à l'antigène amibien.

En comparant les résultats obtenus pour les deux types d'antigènes, on peut, dans une certaine mesure, faire la part de ce qui est spécifique, mais dans certains cas, l'interprétation de la réaction devient extrêmement difficile si l'on observe un nombre d'arcs équivalent face aux extraits amibiens et aux extraits microbiens.

Sa faible sensibilité, enlève à la réaction d'OUCHTERLONY pratiquement toute valeur diagnostique pour les amibiases uniquement intestinales, où, même en immuno-fluorescence, les taux obtenus sont relativement peu élevés. Par ailleurs, la précipitation simple en gélose ne permet pas évidemment une étude quantitative de ces sérums.

Enfin, sur le plan pratique, si la réaction d'OUCHTERLONY est de réalisation très simple, et ne nécessite aucun appareillage spécialisé, elle se heurte à tous les problèmes d'obtention et de purification de l'antigène amibien soluble, et surtout, elle nécessite une très grande quantité de matériel parasitaire.

5° - VALEUR DE LA REACTION D'IMMUNO-FLUORESCENCE COMME MOYEN DE CONTROLE POST-THERAPEUTIQUE

Notre expérience ne porte encore que sur quatre malades, trois présentant un abcès amibien du foie, le quatrième un amœbome caecal.

Les sérums ont été étudiés en immuno-fluorescence au fur et à mesure qu'ils nous parvenaient, mais pour pouvoir établir l'évolution sérologique de ces malades avec plus de précision, nous avons repris ces sérologies en une même série de réactions lorsque les échantillons de sérum les plus récents sont arrivés au Laboratoire. Les échantillons précédents étaient conservés au congélateur à azote liquide de manière à ne pas risquer une

baisse du taux des anticorps, d  e à la conservation.

. Abcès du foie

- n  _115 : Au moment du traitement : positif à 1/800

Deux mois après la fin du traitement : positif à
1/200

Quatre mois après la fin du traitement : positif
   1/100

- n  _142 : Au moment du traitement : positif à 1/1600

20 jours après la fin du traitement : positif à
1/800

Sept mois après la fin du traitement : positif
   1/200

- n  _177 : Au moment du traitement : positif à 1/400

Deux mois plus tard : positif à 1/100

. Amoebome caecal

Pour le seul cas d'amoebome caecal que nous ayons pu étudier, les sérologies n'ont pu être pratiquées avant le traitement chirurgical ou au moment de cette cure.

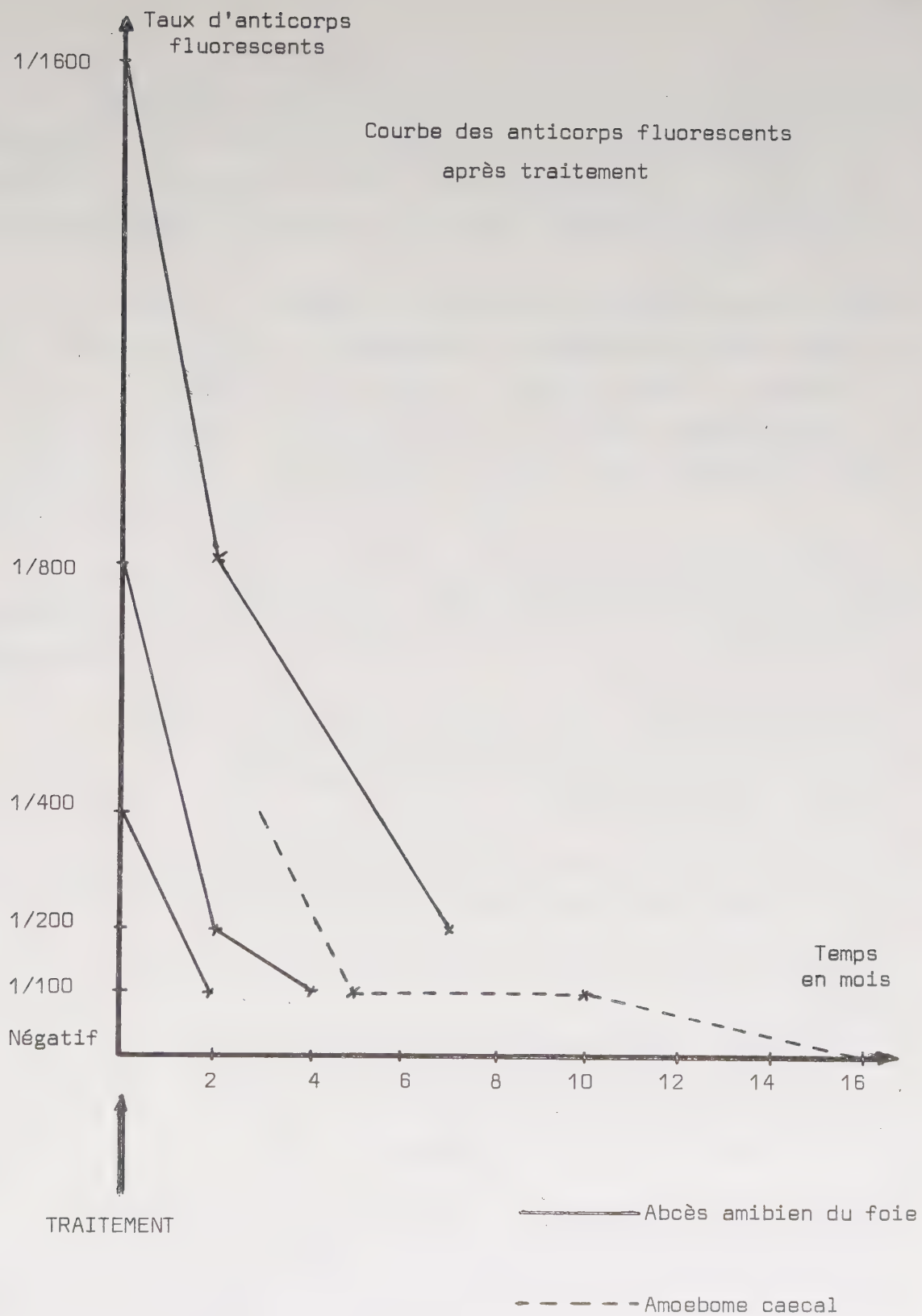
- n  _42 : Trois mois après intervention chirurgicale :
positif à 1/400

Cinq mois après : positif à 1/100

Dix mois après : positif à 1/100

Seize mois après : négatif

Ces différents résultats sont résumés dans le graphique de la page suivante.



Notre étude ne nous permet pas d'apprécier les modifications de la sérologie, sous l'effet du traitement, puisque dans tous les cas, c'est au moment de ce traitement, ou même, pour l'amoebome caecal, trois mois après que nous avons pu commencer à effectuer les examens sérologiques.

A partir du traitement, on assiste à une baisse rapide et importante du taux des anticorps fluorescents. La négativation totale semble longue à survenir, puisque pour les trois cas d'abcès du foie, la réaction d'immuno-fluorescence est encore positive à 1/100 après respectivement 2, 3 et 7 mois, et que, pour le cas d'amoebome caecal, cette négativation ne s'est produite qu'entre le 10ème et le 16ème mois.

En ce qui concerne les formes hépatiques, nous avons pu pratiquer une réaction isolée chez des malades ayant eu un abcès du foie guéri depuis plusieurs années :

- n° 267 : malade ayant présenté en 1945 un abcès du foie et du poumon traité par éméline et cure chirurgicale. En mars 1967, immuno-fluorescence négative.
- n° 311 : abcès amibien du foie traité en 1956. Pas de rechute. Le 17 juin 1967, immuno-fluorescence négative.
- n° 345 : malade ayant présenté un abcès amibien du foie en 1955, et de multiples rechutes intestinales traitées au total par treize cures d'émétine ; hospitalisé avec un syndrome évoquant une rechute hépatique possible. Immuno-fluorescence le 30 août 1967, négative. En fait, il s'agissait d'une cholécystite.

Il est donc possible que l'immuno-fluorescence puisse présenter une certaine valeur comme test de guérison, dans la mesure cependant, où des examens répétés permettent d'apprécier les variations quantitatives importantes, la négativation de la sérologie ne pouvant être obtenue qu'après un

recul assez important. C'est du moins ce que semble suggérer notre expérience actuelle, encore très limitée.

Dans l'ensemble, ces résultats paraissent indiquer que l'immuno-fluorescence est légèrement supérieure à la fixation du complément et à l'hémagglutination pour suivre l'évolution post-thérapeutique des malades, si l'on se réfère en particulier, aux publications de CRAIG et surtout de KESSEL.

o

o o

V - INTERPRETATION DES RESULTATS

a) Amibiases expérimentales :

La sérologie est alors le plus souvent négative car la survie des animaux inoculés par voie intra-caecale ou par voie intra-hépatique et non traités, est trop courte.

Dans notre étude, nous avons retrouvé trois sérologies nettement positives chez des hamsters inoculés par voie intra-hépatique. Dans ces trois cas, il s'agissait d'animaux traités, qui de ce fait, avaient survécu plus de quinze jours après l'infestation.

b) Amibiases humaines :

- 1 - Pour les sérologies très positives, de 1/800 à 1/3200, on peut pratiquement affirmer l'atteinte hépatique.
 - 2 - Pour les sérologies moyennement positives, 1/200 à 1/400 on peut évoquer :-soit l'abcès du foie évolutif ou en voie de guérison
- soit une forme intestinale assez marquée avec *Entamoeba histolytica* dans les selles.
 - 3 - Pour les sérologies faibles, 1/100 et surtout 1/50, l'interprétation est impossible. Elle n'a de valeur qu'en fonction du contexte clinique.
- . Il s'agit le plus souvent d'amibiase intestinale dans sa forme aiguë, chronique ou rechute aiguë

- . Il peut s'agir aussi d'un taux séquellaire d'une hépatite aiguë ou d'une forme dysentérique récentes mais guéries.
- . Chez les africains, ces taux sont parfois relevés sans que la moindre notion d'atteinte amibienne clinique soit retrouvée.

4 - Une sérologie négative permet pratiquement d'éliminer un abcès amibien du foie. Mais elle n'élimine pas absolument une atteinte intestinale actuelle. Elle n'élimine pas non plus les porteurs sains de formes minuta végétatives ou kystiques. Elle se rencontre dans les cas de colites méta-amibiennes et dans les cas d'amibiases anciennes guéries sans séquelle.

En somme, la sérologie appliquée à l'amibiase doit le plus souvent rester un complément des investigations cliniques et coprologiques classiques. En effet, la faible intimité entre les tissus et le parasite, fait que l'induction des anticorps est le plus souvent modérée. Par contre, dès que le parasite est franchement intra-tissulaire, cette sérologie se comporte comme dans la plupart des autres affections tissulaire et elle devient alors très significative.

o

o o

Chapitre IV

LES ACQUISITIONS ET LES PERSPECTIVES DE L'IMMUNO-FLUORESCENCE DANS LA SEROLOGIE DE L'AMIBIASE

L'ensemble des travaux que nous avons envisagés précédemment, indique bien la complexité des phénomènes immunologiques au cours de l'amibiase.

Comme l'indique ELSDON-DEW, cette complexité tient d'abord aux relations hôte-parasite.

En effet, au cours du cycle non pathogène où n'existent que les formes minuta, les amibes vivent à la surface de la muqueuse intestinale ; elles se comportent comme de véritables saprophytes et n'entraînent aucune réponse immunologique.

Ce n'est que lors du cycle pathogène, à forme histolytica, que la pénétration des parasites dans les tissus provoque l'apparition d'anticorps spécifiques. Ces anticorps sont présents à des taux plus élevés dans les cas d'amibiases viscérales, hépatiques en particulier, que dans les formes

purement intestinales.

Sur ce schéma général, viennent encore se greffer les facteurs épidémiologiques : les fréquentes recontaminations des sujets vivant en zone d'endémie peuvent provoquer des anticorps décelables même en dehors des périodes aiguës de la maladie.

Enfin, tous les problèmes liés aux relations entre l'hôte et le parasite viennent encore se compliquer d'inter-réactions entre les amibes et la flore microbienne intestinale. En effet, si l'organisme peut, en cas d'amibiase aiguë, élaborer des anticorps anti-*Entamoeba histolytica*, il réagit également face aux germes qui vivent en symbiotes ou en commensaux des amibes et peuvent avoir leur pathogénicité propre.

Sur le plan du diagnostic sérologique, l'un des problèmes fondamentaux, revient donc à distinguer les anticorps spécifiques des anticorps correspondant aux germes microbiens. Ceci est d'autant plus difficile que l'antigène employé pour les réactions sérologiques est préparé à partir de cultures d'amibes qui comportent presque toujours une importante flore microbienne dont une partie est phagocytée par les parasites. On voit donc quelles difficultés peut supposer la préparation et surtout la purification d'un antigène amibien soluble. De rares laboratoires très spécialisés ont pu utiliser des cultures amibiennes pures (SCHNEIDER et THOMPSON) ou bien ne comportant qu'une seule espèce de germe ou de parasite associée (*Trypanosoma cruzi*) par exemple. Dans la majorité des cas cependant, l'antigène utilisé n'est que rarement spécifique, ce qui explique l'inégalité des résultats obtenus par les différents auteurs et les difficultés que rencontre la sérologie de l'amibiase pour entrer dans la pratique courante.

Dans ce cadre général, quelles sont les acquisitions actuelles et les perspectives de l'Immuno-fluorescence en matière d'amibiase, telles qu'elles se dégagent de nos résultats, de ceux de JEANES et surtout des travaux de GOLDMAN.

1 - Du point de vue de la recherche fondamentale on a pu procéder (GOLDMAN) à une différenciation antigénique des diverses espèces d'amibes parasites ou saprophytes. C'est ainsi qu'il existe d'importantes différences antigéniques entre *Entamoeba histolytica* et les autres amibes (*Entamoeba coli*, *Entamoeba moshkowsky*, etc...). Cette différence entre les espèces est assez nette pour être facilement retrouvée. Nous avons pu nous-même la vérifier en ce qui concerne *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli* et *Entamoeba invadens*.

La différenciation antigénique des diverses souches d'*Entamoeba histolytica* est plus difficile à réaliser et suppose des conditions expérimentales très précises (GOLDMAN). Il semble cependant que toutes les amibes de l'espèce *Entamoeba histolytica* possèdent des antigènes communs mais que certaines souches présentent en outre un ou plusieurs antigènes particuliers qui sont peut être en rapport avec leur pouvoir pathogène.

Sur le plan théorique, ces recherches présentent un intérêt considérable pour la classification des amibes. Elles ont par exemple fourni un argument supplémentaire pour l'individualisation de l'espèce *Entamoeba hartmanni* (GOLDMAN, 1960, 1961, 1962).

2 - Mais ces travaux peuvent également avoir des prolongements très importants sur le plan diagnostique des souches. Il est en effet possible que l'on arrive à distinguer certaines variétés particulièrement pathogènes à l'intérieur de l'espèce *Entamoeba histolytica* (par analogie avec ce qui est connu, par exemple, pour *Escherichia coli*). Jusqu'ici on a considéré que le passage de l'amibiase-infection à l'amibiase-maladie dépend essentiellement de l'état général du sujet ou de la flore microbienne intestinale. Il est indiscutable que ces éléments jouent un grand rôle, mais il est possible que la virulence propre à certaines souches intervienne également. Ceci rejoindrait d'ailleurs les constatations cliniques et épidémiologiques déjà anciennes, faites dans certaines zones d'endémie (Extrême-Orient

par exemple), où l'amibiase revêt une gravité particulière.

Ce sérotypage des amibes dysentériques semble théoriquement possible. Il ne faut pas toutefois mésestimer les difficultés qu'il présente encore.

3 - Diagnostic sérologique de l'amibiase

Les résultats sont ici beaucoup plus démonstratifs puisque l'immuno-fluorescence s'affirme d'ores et déjà comme l'une des meilleures techniques sérologiques applicables à l'amibiase.

Sa spécificité et sa sensibilité en font un moyen de diagnostic extrêmement précieux dans les formes hépatiques. Elle peut être intéressante dans les formes intestinales, en aidant à distinguer les formes purement séquellaires des amibiases encore évolutives. Enfin, il est possible que l'immuno-fluorescence puisse constituer un moyen supplémentaire permettant de contrôler l'efficacité du traitement.

Certes, d'autres techniques sérologiques présentaient une valeur sensiblement comparable à celle de l'immuno-fluorescence, mais celle-ci offre de très importants avantages sur le plan pratique. Elle nécessite évidemment une installation microscopique spéciale, mais ce n'est plus un inconvénient majeur étant donné la généralisation de ce type d'équipement. Par contre, elle fait appel à un antigène figuré dont la préparation et la purification sont faciles et qui peut être conservé longtemps sous forme lyophilisée.

C'est là sans doute un des atouts majeurs de l'immuno-fluorescence qui paraît destinée à une large utilisation et permettra peut-être à la sérologie de l'amibiase de quitter le cadre de quelques rares laboratoires très spécialisés, pour entrer dans la pratique diagnostique courante.

C O N C L U S I O N S

I - Pour l'étude sérologique de l'amibiase humaine, nous avons mis au point une technique d'Immuno-fluorescence sur étalements d'*Entamoeba histolytica* de culture. Une longue étude expérimentale nous a permis de simplifier l'exécution de cette réaction. C'est ainsi que nous avons précisé les conditions optimales de préparation de l'antigène, les différentes possibilités de conservation de ce réactif, notamment par lyophilisation, et l'intérêt de la contre-coloration par le Bleu d'Evans. Depuis trois ans, cette réaction a, au total, été appliquée à l'étude de 560 sérums, et elle a pu être utilisée, en pratique, pour le diagnostic sérologique de l'amibiase.

II - Sur le plan pratique, cette technique présente d'importants avantages matériels. Elle permet l'emploi d'une quantité minime de parasites. L'antigène est assez facilement préparé et surtout purifié, ce qui permet d'envisager une utilisation beaucoup plus large que celle des réactions faisant appel à un antigène soluble (fixation du complément, hémagglutination, etc...), ou utilisant également un antigène figuré, mais dont la réalisation et l'interprétation est plus délicate (agglutination des trophozoïtes ou de kystes, immobilisation de trophozoïtes).

III - La spécificité de notre réaction a été vérifiée par l'étude de 140 sérums, prélevés chez des sujets sains ou présentant différentes affections parasitaires ou non. Cette spécificité est totale, dans la mesure où l'on retient comme significative la dilution de 1/50.

Par ailleurs, nous avons pu analyser 30 sérums humains (amibiens ou sujets témoins), et 15 sérums expérimentaux, que nous avons fait réagir face à différentes souches de *Entamoeba histolytica*, ou face à

d'autres espèces d'amibes. Nos résultats qui confirment ceux de GOLDMAN, n'ont pas montré de réactions croisées avec ces dernières.

IV - La reproductibilité de la technique d'Immuno-fluorescence a été vérifiée qualitativement et quantitativement au cours de plusieurs séries d'examen. Nous n'avons pas enregistré de variations qualitatives et les différences quantitatives n'ont jamais excédé un taux de dilution.

V - Pour préciser la valeur diagnostique de notre réaction, nous avons étudié des sérums d'animaux infestés expérimentalement, ainsi que 390 sérums humains prélevés chez des sujets suspects d'amibiase, ou présentant une amibiase confirmée. Des résultats positifs ont été enregistrés dans tous les cas d'hépatites amibiennes ou d'abcès amibiens du foie, les taux observés étant en moyenne de 1/1200 environ (limites extrêmes de 1/200 à 1/3200).

Pour les formes intestinales aiguës de primo-infestation ou pour les rechutes aiguës d'amibiases anciennes, on n'a observé que 15 réactions positives sur 18 cas, et ceci, à des taux allant de 1/50 à 1/400.

Enfin, pour les formes anciennes, les porteurs sains, ou les colites méta-amibiennes, les résultats sont presque toujours négatifs, que l'examen révèle ou non la présence de formes minuta ou de kystes.

Des résultats également négatifs ont été enregistrés au cours d'examen systématiques effectués chez des Européens ayant séjourné en zones d'endémie amibienne, et ne présentant pas d'antécédents amibiens.

Par contre, une étude pratiquée chez des Africains originaires d'une zone d'endémie, a révélé une faible positivité chez un tiers des sujets ; ce n'est que dans ce dernier cas, que nous avons observé des différences significatives en fonction de l'origine ethnique des malades examinés.

De l'ensemble de notre étude, il résulte que l'immuno-fluorescence présente une valeur diagnostique largement comparable à celle des meilleures réactions utilisées jusqu'ici. Nous avons pu, d'ailleurs, le

vérifier en ce qui concerne la précipitation simple en gélose, avec laquelle nous avons analysé 66 sérums qui avaient déjà été étudiés en immuno-fluorescence. Par la recherche des anticorps fluorescents, il semble possible dans une certaine mesure, de départager les amibiases séquellaires des formes encore évolutives, et de faire le diagnostic des formes intestinales aiguës. Mais c'est surtout pour les formes hépatiques que cette recherche prend toute sa valeur.

VI - L'évolution sérologique post-thérapeutique a pu être précisée en pratique pour quatre malades présentant un abcès du foie (3 cas) et un amœbome caecal. On assiste à une diminution importante et assez rapide du taux des anticorps fluorescents qui persiste cependant pendant un temps assez long. Par des examens répétés, l'immuno-fluorescence constitue donc un moyen de contrôle post-thérapeutique, et même, éventuellement, un test de guérison. Dans ce domaine, ses possibilités sont assez comparables et peut-être légèrement supérieures à celles des autres réactions sérologiques (fixation du complément, hémagglutination).

VU, le Doyen :
Pour le Doyen
L'Assesseur
J. DORCHE

Le Président de la Thèse :
J. COUDERT

Vu et permis d'imprimer
Lyon, le 27 novembre 1967

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université
P. LOUIS

o

o o

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - AMBROISE-THOMAS P.

L'immuno-fluorescence dans le diagnostic direct et indirect des parasitoses. Applications à la toxoplasmose.
. Thèse Médecine Lyon, 1963, 160 p. 115 Ref.

- 2 - AMBROISE-THOMAS P., GARIN J.P. et Melle RIGAUD A.

Amélioration de la technique d'Immuno-fluorescence par l'emploi de contre-colorants. Application aux toxoplasmes.
. Presse Médicale, 1966, 43 : 2215-2216.

- 3 - ATCHLEY F.O., AUERHEIMER A.H. et WASLEY M.A.

Precipitate patterns in agar gel with sera from human amebiasis and Entamoeba histolytica antigen.
J. Parasit. 1963, 49 : 313-315.

- 4 - BIAGI F. et BUENTELO L.

Immobilization reaction for the diagnostic of amoebiasis.
. Expl. Parasit. 1961, 11 : 188-190.

- 5 - BIAGI F., BELTRAN H.F. et ORTEGA P.S.

Remobilization of Entamoeba histolytica after exposure to immobilizing antibodies.
. Expl. Parasit. 1966, 18, n° 1 : 87-91.

- 6 - BOZICEVICH J.E.

Discussion on amoebiasis.
. Am. J. Trop. Med. 1950, 30 : 154.

- 7 - BOZICEVICH J.E.

Serological consideration relative the diagnosis of
amoebiasis.
. Amer. J. Gastroenterol. 1953, 23 : 332.

- 8 - BROWN J.A. et WITHBY J.L.

An immobilisation test for amoebiasis
. J. Clin. Path. 1955, 8 : 245-246.

- 9 - BUCHMAN E., KULLMAN H.J. et MARGONIS G.F.

Evaluation of the complement fixation test in amoebiasis.
. Gastroenterology 1952, 21 : 391.

- 10 - CHANCO P.P., RAMIREZ J. et MEDINA C.E.

Complement fixation test for amoebiasis. Some observations.
. St. Thomas J. Med. 1956, 11 : 204.

- 11 - COLE B.A. et KENT J.F.

Immobilization of endamoeba histolytica in vitro by antiserum
produced in the rabbit.
. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1953, 83 : 811-814.

- 12 - COUDERT J.

Antigènes lyophilisés en parasitologie.
. Presse Médicale 1955, 52 : 1080-1081.

- 13 - COUDERT J.

Utilisation des antigènes lyophilisés pour le diagnostic des
maladies parasitaires.
. ANN. Biol. Clin. 1961, 12 : 1-9.

- 14 - COUDERT J., GARIN J.P., AMBROISE-THOMAS P. et GEORGET J.P.

Diagnostic sérologique de l'Amibiase par l'immuno-
fluorescence. Résultats de 160 examens.
. Bull. Soc. Path. Exot. 1967, A paraître.

- 15 - CRAIG C.F.

Observation upon the hemolytic, citolytic and complement-
binding properties of extracts of *Entamoeba histolytica*.
. Am. J. Trop. Med. 1927, 7 : 225-240.

- 16 - CRAIG C.F.

Observation upon complement fixation in infections with
Entamoeba histolytica.
. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 1928, 14 : 520-526.

- 17 - CRAIG C.F.

Complement fixation in the diagnostic of infections with
Entamoeba histolytica.
. Am. J. Trop. Med. 1928, 8 : 29-37.

- 18 - CRAIG C.F.

The technic and results of a complement fixation test
for the diagnosis of infections with *Entamoeba histolytica*.
. Am. J. Trop. Med. 1929, 9 : 227-296.

- 19 - CRAIG C.F.

The diagnostic value of the complement fixation test in
amebic infections.
. J.A.M.A., 1930, 95 : 10-13.

- 20 - CRAIG C.F.

Complement fixation in the diagnosis of amoebiasis.
. Ann. Int. Med. 1931, 5 : 170-177.

- 21 - CRAIG C.F.

Further observations upon the complement fixation test in the diagnosis of amoebiasis.

. J. Lab. Clin. Med. 1933, 18 : 873-881.

- 22 - CRAIG C.F. et KAGY E.

A study of complement fixation in experimental amoebiasis in dogs.

. Am. J. Hyg. 1933, 18 : 202-219.

- 23 - CRAIG C.F. et SCOTT L.C.

Observations on antigens for complement fixation in amoebiasis.

. Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 1935, 32 : 958-960.

- 24 - CRAIG C.F.

The diagnostic value of the complement test in amoebiasis.

. Rev. Parasit. Clin. Lab. 1936, 2 : 305-314.

- 25 - CRAIG C.F.

Observations upon the practical value of the complement fixation test in the diagnosis of amoebiasis.

. Am. J. Publ. Hlth. 1937, 27 : 689-693.

- 26 - CRAIG C.F. et SWARTZWELDER J.C.

Observations upon complement fixation test in monkeys infected with Entamoeba histolytica.

. Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 1938, 37 : 671-673.

- 27 - CRAIG C.F.

The nature and practical value of the complement fixation test in amoebiasis.

. Texas State J. Med. 1939, 35 : 554-560.

- 28 - CRAIG C.F.

Amoebiasis and the complement fixation test.
. US Armed Forces Med. J. 1950, 1 : 1337-1342.

- 29 - DE BLAZI R. et MAGAUDDA-BORZI L.

Rivista sintetiche e critiche : La Sérologia dell'amebiasi.
. Riv. Parassit. 1958, 19 : 267-296.

- 30 - DE BLAZI R. et MAGAUDDA-BORZI L.

Moderne acquisizioni sulla struttura antigene del genere entamoeba.
. Ann. Sclavo. 1966, 8 : 5-25.

- 31 - DESCHIENS R. et POIRIER M.

L'immunité dans les affections parasitaires.
. Ann. Inst. Pasteur 1952, 83 : 725.

- 32 - DESCHIENS R.

L'amibiase et l'amibe dysentérique.
Masson. Editeur, 1965.

- 33 - DIAMOND L.S.

Axenic cultivation of Entamoeba histolytica.
. Science 1961, 134 : 336-337.

- 34 - DOLKART R.E., HALPERN B. et CULLEN J.

The diagnostic of amoebiasis, the role of the complement fixation test and the incidence of the disease in the Chicago area.
. J. Lab. Clin. Med. 1951, 38 : 804.

- 35 - DOUCHET Ch.

Essais d'application de la réaction de diffusion en milieu gélifié à quelques parasitoses (selon la technique d'OUCHTERLONY).
. Thèse Médecine, Lyon, 1958.

- 36 - ELSDON DEW R. et MADDISON S.E.

Amoebic complement fixation reaction.
. J. Trop. Med. Hyg. 1952, 55 : 208-211.

- 37 - ELSDON DEW R.

Immunology in amoebiasis.
. The leech, 1965, 5 : 116-120.

- 38 - FREEDMAN L., MADDISON S.E. et ELSDON DEW R.

Monoxenic cultures of Entamoeba histolytica derived from human liver abscesses.
. S. Afr. J. Med. Sci. 1958, 23 : 9-12.

- 39 - FULTON J.D., JOYNER L.P. et ORPWOOD PRICE.

Studies on protozoa. IV. A complement fixation test for amoebiasis.
. J. Trop. Med. Hyg. 1951, 54 : 27.

- 40 - GARIN J.P. et AMBROISE-THOMAS P.

Le diagnostic sérologique de la toxoplasmose par la méthode des anticorps fluorescents (Technique indirecte).
. Presse Médicale 1963, 52 : 2485-2488.

- 41 - GOLDMAN M.

Cytochemical differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba coli by means of fluorescent antibody.
. Am. J. Hyg. 1953, 58 : 319-328.

- 42 - GOLDMAN M.

Use of fluorescein-tagged antibody to identify cultures of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*.
. Am. J. Hyg. 1954, 59 : 318-325.

- 43 - GOLDMAN M.

Microfluorimetric evidence of antigenic difference between *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba hartmanni*.
. Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 1959, 102 : 189-191.

- 44 - GOLDMAN M.

Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody. I. Instrumentation for micro-fluorimetry of stained amoebae.
. Expl. Parasit. 1960, 9 : 25-36.

- 45 - GOLDMAN M., CARVER R.K. et GLEASON N.N.

Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody. II. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba hartmanni*.
. Expl. Parasit. 1960, 10 : 366-388.

- 46 - GOLDMAN M. et GLEASON N.N.

Antigenic relationships of two strains of *Entamoeba histolytica* and one of *Entamoeba hartmanni* as shown by cross absorption of fluorescent antisera to each strain.
. J. Parasit. 1961, 47 : 29.

- 47 - GOLDMAN M., GLEASON N.N. et CARVER R.K.

Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody. III. Reaction of the Laredo strain with five anti-*histolytica* sera.
. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1962, 11 : 341-346.

- 48 - GOLDMAN M. et GLEASON N.N.

Antigenic analysis of *Entamoeba histolytica* by means of fluorescent antibody. IV. Relationships of two strains of *Entamoeba histolytica* and one of *Entamoeba hartmanni*, demonstrated by cross absorption techniques.
. J. Parasit. 1962, 48 : 778-783.

- 49 - GOLDMAN M.

Immunofluorescent diagnosis of amoebiasis.
. Proc. 7 th internat. Cong. Trop. Med. and Malar.
1964, 2 : 277.

- 50 - GOLDMAN M. et SIDDIQUI W.A.

Antigenic comparison of two substrains of *Entamoeba histolytica* by gel diffusion and immunoelectrophoresis.
. Expl. Parasit. 1965, 17 : 326-331.

- 51 - GOLDMAN M.

Evaluation of a fluorescent antibody test for amoebiasis using two widely differing ameba strain as antigen.
. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1966, 15 : 694-700.

- 52 - GREFF R.G.L.

Agglutination of *Entamoeba histolytica*.
. Am. J. Trop. Hyg. 1947, 27 : 131.

- 53 - HALL B. et CARRUTHERS H.L.

Observations on the value of the complement fixation test in the diagnosis and management of amoebiasis.
. Med. J. Aust. 1957, 1 : 32-36.

- 54 - HEINZ H.J., Mc NAB C.M. et FREEMAN F.

The role of the bone marrow in antibody production in amoebiasis.
. S. Afr. J. Med. Sci. 1958, 23 : 13-16.

- 55 - HOARE C.A.

The enigma of host parasite relations in amoebiasis.
 . The rice Institute Pamphlet, 1958, 45 : 23-35.

- 56 - HUSSEY K.C., BROWN H.W.

The complement fixation test for hepatic amoebiasis.
 . Am. J. Trop. Med. 1950, 30 : 147.

- 57 - IZAR G.

Studien ueber amoebenenteritis.
 Mitteilung : Ueber das Vorkommen spezifischer Antikoerper
 in Serum von Amoebenrurkranken.
 . Arch. F. Schiff. Tropen-Hyg. 1914, 18 : 41-79.

- 58 - JARUMILINTA R.

A simple method of inducing amebic liver abcess in hamsters.
 . Ann.Trop. Med. Parasit. 1966, 60 : 1939-1945.

- 59 - JEANES A.J.

Immunofluorescent diagnosis of amoebiasis.
 . Brit. Med. J. 1964, 5423 : 1531.

- 60 - JEANES A.J. et PATH M.L.

Indirect fluorescent antibody test in diagnosis of hepatic
 amoebiasis.
 . Brit. Med. J. 1966, 1 : 1464.

- 61 - KASLIWAL R.M., KENNEY M., GUPTA M.L., SETHI J.P., TATZ J.S. et
 ILLES C.H.

Significance of the complement fixation test in diagnosis
 of amoebiasis in a endemic area.
 . Brit. Med. J. 1966, 2 : 837-838.

- 62 - KENNEY M.

Microkolmer complement fixation test for amoebiasis.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 1952, 1 : 717.

- 63 - KESSEL J.F., LEWIS W.P., SOLOMON M.A. et KIM H.

Preliminary report on a hemagglutination test for
Entamoeba.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1961, 106 : 409-413.

- 64 - KESSEL J.F., LEWIS W.P., SOLOMON M.A. and KIM H.

Serology of amoebiasis.
II. Further results using hemagglutination and complement
fixation test.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 1962, 11 : 312.

- 65 - KESSEL J.F., LEWIS W.P., MOLINA PASQUEL C. et TURNER A.

Indirect hemagglutination and complement fixation test in
amoebiasis.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 1965, 14 : 540-550.

- 66 - KIEFER E.D.

The craig complement fixation test for amoebiasis in
chronic ulcerative colitis.
Am. J. Med. Sc. 1932, 183 : 624-631.

- 67 - KRUPP I.M.

Immunoelectrophoretic analysis of several strains of
Entamoeba histolytica.
. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1966, 15 : 849-854.

- 68 - KUM YON KON

The immunological diagnosis of amebic dysentery.
J. Microbiol epidemiol. and immunobiol. 1958, 29 : 88-94.

- 69 - LEAL R.A.

Intra dermo reação na amebiasi contribuição para o sur estudo.
Thesis 1953 Sao Paulo.

- 70 - LEWIS W.P. et KESSEL J.K.

Hemagglutination in the diagnosis of toxoplasmosis and
Amoebiasis.

. Arch. ophtl. 1961, 66 : 471-476.

- 71 - LIPPI M., CAPOCACCIA L. et CAO-PINA M.

Ricerche sulla reazione di deviazione del complemento nell
amebiasis.

. Arch. It. Sci. Med. Trop. Parasit. 1952, 33 : 605-618.

- 72 - Mc DEARMAN S.V. et DUNHAM W.B.

Complement fixation test as an aid in the differential
diagnosis of extra intestinal amoebiasis.

. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1952, 1 : 182-188.

- 73 - Mc HARDY G.

The Moan precipitin test for amoebiasis.

. Gastroenterology 1957, 30 : 535.

- 74 - MADDISON S.E. et ELSDON DEW R.

Non specific antibodies in amoebiasis.

. Expl. Parasit. 1961, 11 : 90-92.

- 75 - MADDISON S.E.

Characterisation of Entamoeba histolytica antigen antibody
reaction by gel diffusion.

. Expl. Parasit. 1965, 16 : 224-235.

- 76 - MADDISON S.E., POWELL S.J. et ELSDON DEW R.

Application of serology to the epidemiology of amoebiasis.
. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1965, 14 : 554-557.

- 77 - MADDISON S.E., POWELL S.J. et ELSDON DEW R.

Comparison of hemagglutinins and precipitins in amoebiasis.
. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1965, 14 : 551-553.

- 78 - MAEGRAITH B.G. et HARINASUTA C.

Experimental amoebic infection of the liver in guinea pigs.
I. Infection via the mesenteric vein and via the portal
vein.
. Ann. Trop. Med. Parasit. 1964, 48 : 421-433.

- 79 - MAESTRONE G.

Demonstration of leptospiral and viral antigens in formalin
fixed tissues.
. Nature 1963, 197 : 409-410.

- 80 - MAGATH T.B. et MELENEY H.E.

The complement fixation reaction for amoebiasis ; comparative
tests performed by two laboratories.
. Am. J. Trop. Med. 1940, 20 : 211-238.

- 81 - MELENEY H.E. et FRYE W.W.

Practical value and significance of the complement fixation
reaction in amoebiasis.
Am. J. Publ. Hlth. 1937, 27 : 505-510.

- 82 - MELENEY H.E.

Some involved problems in amoebiasis.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 1957, 6 : 487-498.

- 83 - MENEDEZ P.E.

Serological relationships of *Entamoeba histolytica*.
. Am. J. Hyg. 1932, 15 : 785-808

- 84 - MILGRAM E.A., HEALY G.R. et KAGAN I.G.

Studies on the use of the indirect hemagglutination test
in the diagnosis of amoebiasis.
. Gastroenterology 1966, 50 : 645-649.

- 85 - MOAN J.C.

The serological diagnosis of amoebiasis by means of the
precipitin test.
. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1957, 6 : 499-513.

- 86 - NAKAMURA M. et BAKER E.E.

Agar diffusion precipitin technic for the detection of
antibodies against *Entamoeba histolytica*.
. Bact. Proc. 1957, 10 : 95.

- 87 - NAKAMURA M.

Inhibition of *Entamoeba histolytica* in vitro by specific
antibody.
. Parasitology 1959, 49 : 104-107.

- 88 - NAKAMURA M.

A serological study of amoebiasis using the agar gel
technic.
. J. Protozool 1961, 8 : 18-19.

- 89 - PAULSON, MOSES et ANDREWS J.

Complement fixation test in amoebiasis ; a comparative
evaluation in clinical practice.
. Arch. Int. Med. 1938, 61 : 562-578.

- 90 - PHILLIPS B.P.

Comparative effects of certain species of Trypanosomidae on the growth of *Entamoeba histolytica* in the absence of bacteria.

. Am. J. Trop. Med. 1951, 31 : 290.

- 91 - PHILLIPS B.P.

Further studies with trypanosome cultures.

. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1962, 11 : 6-11.

- 92 - POWELL S.J., MADDISON S.E., WILMOT A.J. et ELSDON DEW R.

Amoebic gel diffusion precipitin test, clinical evaluation in amoebic liver abscess.

. Lancet, 1965, 25 : 602-603.

- 93 - POWELL S.J., MADDISON S.E., HODGSON R.G. et ELSDON DEW R.

Amoebic gel diffusion precipitin test, clinical evaluation in acute amoebic dysentery.

. Lancet, 1966, 12 : 566-567.

- 94 - REES C.W., BOZICEVITCH, REARDON L.V. et JONES F.

A preliminary note on the complement fixation test for amoebiasis with antigens prepared from *Entamoeba histolytica* grown with a single species of bacteria.

. Am. J. Trop. Med. 1942, 22 : 581-586.

- 95 - REEVES R.E. et WARD A.B.

Large lot cultivation of *Entamoeba histolytica*.

. J. Parasit. 1965, 51 : 321-324.

- 96 - SCALAS L.

Contributo allo studio della deviazione del complemento nella dissenteria amebica.

. Rif. Med. 1921, 37 : 103-104.

97 - SCALAS L.

L'intra-dermo reazione nella dissenteria amebica.
. Rif. Med. 1923, 39 : 967.

98 - SECRET E.

Tentative d'intra-dermo-réaction pour le diagnostic de
l'amibiase.
. Maroc Med. 1952, 13 : 436-437.

99 - SEN A., GHOSH S.N., MUKERJEE S. et RAY J.C.

Antigenic structure of Entamoeba histolytica.
. Nature, 1961, 192 : 893.

100 - SHAFFER J.G. et ANSFIELD J.

The effect of rabbit antisera on the ability of Entamoeba
histolytica to phagocytose red blood cells.
. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1956, 5 : 53-61.

101 - SHERWOOD N.P. et HEATMAN L.

Further studies on the antigenic properties of pathogenic
and free living amoeba. Complement fixation in amoebic
dysentery.
. Am. J. Hyg. 1932, 16 : 124-136.

102 - SIDDIQUI W.A.

Demonstration of antigen antibody reaction with a mono-
bacterial culture of Entamoeba histolytica in agar gel and
on cellulose acetate membrane.
. J. Parasit. 1961, 47 : 371-372.

103 - SIDDIQUI W.A. et BALAMUTH W.

Serological comparison of selected parasitic and free living
amoebic in vitro using diffusion precipitation and fluo-
rescent antibody technics.
. J. Protozool, 1965, 13 : 175-182.

- 104 - SINGH L.M. et SINGH B.N.

Antigenic difference in free living and parasitic amoebae as revealed by immobilization reaction.
. Indian J. Exp. Biol. 1966, 4 : 49-50.

- 105 - SPECTOR B.K.

A comparative study of cultural and immunological methods of diagnosis infections with *Entamoeba histolytica*.
. J. Prev. Med. 1932, 6 : 117-128.

- 106 - STEIGMANN F., SHLAES W.H., MINTZER S et SCHAEFFER G.

An amebiasis complement fixation test in the diagnosis of intestinal amebiasis.
. Gastroenterology, 1953, 23 : 70.

- 107 - STONE W.S.

Bacteria-free antigen for complement fixation test in amebiasis.
. Am. J. Trop. Med. 1935, 15 : 685-687.

- 108 - SWART D.L. et WARREN L.G.

The origin of antigenic substances in *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903, and serologic manifestations of their antibody inducing properties.
. J. Parasit. 1962, 48 : 124-130.

- 109 - TAKUMI K., TAKEBAYASHI I, TAKEUCHI H., IKEDAH et TOSHIOKA N.

The use of lyophilised parasites in indirect fluorescent antibody technic for detection of toxoplasma antibody.
. Jap. J. Microbiol. 1966, 10 : 189-191.

- 110 - TERRY L.L. et BOZICEVICH J.

The importance of the complement fixation test in amebic hepatitis and liver abscess.
. Sth. Med. J. 1948, 41 : 691.

- 111 - TSUCHIYA H.

Studies on the complement fixation test for amoebiasis.
. J. Parasit. 1932, 19 : 161.

- 112 - TSUCHIYA H.

Further studies on the cultivation of *Endamoeba histolytica*
and a complement fixation test for amoebiasis.
. J. Lab. Clin. Med. 1934, 19 : 495-504.

- 113 - VALENTINO L.

La reazione di immobilizzazione nell'amebiasi.
. Rivista Ist. Sieroter. Ital. 1956, 31 : 310-317.

- 114 - WAGENER E.H.

A precipitin test in experimental amoebic dysentery in
cats.
. Univ. Calif. Publs. Zool. 1924, 26, 15-20.

- 115 - WALLS J.W., GOLDMAN M. et GOGEL R.

Evaluation of hemagglutination test for amoebiasis using
a commercial antigen.
. Gastroenterology 1961, 40 : 649-653.

- 116 - WEISS E. et ARNOLD L.

Complement fixation test for amoebias (preliminary report).
. Am. J. Dig. Dis. Nutr. 1935, 1 : 231-233.

- 117 - WEISS E. et ARNOLD L.

The specificity of the complement fixation test for amoebiasis.
. Am. J. Dig. Dis. Nutr. 1935, 1 : 548-552.

- 118 - WEISS E. et ARNOLD L.

A complement fixation test for amoebias an increased antibody content.

. Am. J. Dig. Dis. Nutr. 1938, 4 : 282-287.

- 119 - WELL R.

The amoebic complement fixation test.

. M.J. MALAYA, 1956, 11 : 93-111.

- 120 - ZAMAN V.

Studies with the immobilization reaction in the genus Entamoeba.

. Ann. Trop. Med. Parasit. 1960, 54 : 381-391.

TABLE DES MATIERES

Pages

. INTRODUCTION	12
. PLAN	14
. RAPPEL DES NOTIONS FONDAMENTALES	17
. <u>CHAPITRE I : DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DE L'AMIBIASE PAR LES REACTIONS AUTRES QUE L'IMMUNO-FLUORESCENCE</u>	20
. Recherche de l'allergie cutanée	21
I - <u>REACTIONS SEROLOGIQUES AVEC ANTIGENE SOLUBLE</u>	23
1 - Réaction de fixation du complément	23
2 - Hémagglutination passive	26
3 - Réaction de précipitation	29
- <i>Précipitin-test de MOAN</i>	29
- <i>Précipitation simple en gélose (OUCHTERLONY)</i>	31
4 - Immunoélectrophorèse	34
II - <u>LES REACTIONS SEROLOGIQUES AVEC ANTIGENE FIGURE</u> ...	35
1 - Réaction d'immobilisation des trophozoïtes	35
2 - Agglutination des trophozoïtes et des kystes ..	39
3 - Inhibition des cultures ou du pouvoir phagocytaire	40
III - <u>CONCLUSION</u>	41

. <u>CHAPITRE II : RESULTATS OBTENUS JUSQU'ICI PAR L'IMMUNO-FLUORESCENCE</u>	
<u>APPLIQUEE A L'AMIBIASE</u>	43
1 - Utilisation de la méthode directe d'immuno- fluorescence	43
a) <i>Mode Opératoire</i>	44
b) <i>Résultats</i>	44
2 - Utilisation de la méthode indirecte : Sérodiagnostic de l'amibiase humaine	46
A - Travaux de JEANES 1964 et 1966	46
a) <i>Matériel et méthodes</i>	46
b) <i>Résultats</i>	47
B - Travaux de GOLDMAN 1966	48
1 - Matériel et méthode	48
a) <i>L'antigène</i>	48
b) <i>Les sérums étudiés</i>	49
c) <i>Le conjugué fluorescent</i>	50
d) <i>l'installation microscopique</i>	50
e) <i>exécution de la Réaction</i>	50
2 - Résultats	51
. <u>CHAPITRE III : TRAVAUX PERSONNELS</u>	53
I - <u>ETUDE EXPERIMENTALE</u>	54
A - L'antigène	54
1) <i>Les étalements sur lames d'amibes</i> <i>de culture</i>	54
1/ <i>Origine</i>	54

2/ Conditions habituelles d'entretien	55
3/ Essais de culture sur milieux enrichis	57
4/ Préparation de l'antigène	58
a) <i>Date de prélèvement</i>	58
b) <i>Purification</i>	59
5/ Préparation des étalements - siliconage des lames	61
6/ Conservation	63
a) <i>Par le froid</i>	63
b) <i>Sous forme de suspension lyophilisée</i>	64
2) <i>Les coupes à la congélation de caecums de rats infestés expérimentalement</i>	65
B - Les sérums à tester	66
C - Les conjugués	67
D - Contre-coloration	67
II - <u>TECHNIQUE PROPOSEE</u>	69
III - <u>INTERET DE NOTRE TECHNIQUE D'IMMUNO-FLUORESCENCE</u> ..	72
1/ Avantages matériels	72
2/ Spécificité	72
a) <i>Etude de 140 sérums humains</i>	73
b) <i>Etude antigénique comparée de différentes souches ou espèces d'amibes</i>	74
c) <i>Contrôle de spécificité à partir de sérums expérimentaux</i>	76
3/ Sensibilité	79
4/ Reproductibilité	79

IV - <u>RESULTATS OBTENUS DANS L'ETUDE D'AMIBIASES EXPERIMENTALES OU D'AMIBIASES HUMAINES SPONTANEEES..</u>	80
1/ Amibiases expérimentales	80
a) Du rat inoculé par voie intra-caecale	80
b) Du hamster inoculé par voie intra- hépatique	81
2/ Amibiases humaines	83
a) Hépatites amibiennes et abcès amibiens du foie.....	84
b) Amibiases intestinales aiguës de primo-infestation	88
c) Rechutes aiguës d'amibiases anciennes	89
d) Amibiases intestinales chroniques ...	90
e) Colites méta-amibiennes	91
f) Amibiases anciennes	92
g) Porteurs sains	92
h) Examens systématiques chez des sujets contacts	92
3/ Valeur diagnostique de l'immuno- fluorescence	94
4/ Comparaison de l'immuno-fluorescence et de la précipitation simple en gélose	96
5/ Valeur de la réaction d'immuno-fluorescence comme moyen de contrôle post-thérapeutique	100
V - <u>INTERPRETATION DES RESULTATS</u>	105
. <u>CHAPITRE IV : LES ACQUISITIONS ET LES PERSPECTIVES DE L'IMMUNO- FLUORESCENCE APPLIQUEE A L'AMIBIASE</u>	107
. <u>CONCLUSIONS</u>	111
. <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	114

TRAVAIL DE LA CHAIRE DE
PARASITOLOGIE ET DE PATHOLOGIE EXOTIQUE DE LA
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

